

ANALIZA SLIK CELIČNIH JEDER Z RAČUNALNIŠKIM VIDOM

Katarina Mele

DIPLOMSKA NALOGA
IZ
RAČUNALNIŠTVA IN INFORMATIKE

predložena

Fakulteti za računalništvo in informatiko

Univerze v Ljubljani

kot delna izpolnitev pogoja za pridobitev naslova diplomirana inženirka računalništva

Ljubljana, v septembru 2000

Mentor: prof. dr. Aleš Leonardis, univ. dipl. inž.

Diplomska naloga je bila izdelana pod mentorstvom prof. dr. Aleša Leonardisa, univ. dipl. ing., in je last Fakultete za računalništvo in informatiko v Ljubljani. Za objavlanje in uporabo rezultatov diplomskega dela je potrebno soglasje zgoraj omenjene ustanove.

Kazalo

Kazalo	iii
Seznam slik	v
Analiza slik celičnih jeder z računalniškim vidom	ix
An Analysis of Cell Nucleus Pictures Using Computer Vision	x
1 Uvod	1
2 Priprava slik	2
2.1 Priprava preparata	2
2.2 Zajemanje in digitalizacija slike	4
3 Odkrivanje objektov na sliki	6
3.1 Odkrivanje celičnih jeder	6
3.1.1 Segmentacija s pomočjo metode aktivnih kontur	8
3.1.1.1 Primer s celicami materničnega vratu	8
3.1.1.2 Lastnosti metode aktivnih kontur	18
3.1.2 Segmentacija s pomočjo Houghovega transforma in aktivnih kontur	20
3.1.2.1 Houghov transform	20
3.1.2.2 Metoda s pomočjo HT	21
4 Oris postopka za iskanje robov	24
5 Segmentacija na principu upragovanja	27
5.1 Upragovanje	27
5.2 Izbira praga	27
5.3 Izboljšanje enostavne segmentacije z upragovanjem-odpravljanje šuma	31
5.4 Dodatni predlogi za izboljšanje segmentacije	34
6 Izbira in ocena najboljših povezav	35
6.1 Geometrijske lastnosti	35
6.2 Kriteriji povezljivosti	37
6.3 Postopek izbiranja najustrežnejših povezav	41
6.3.1 Korak 1 – ohranimo najbližje povezave	42
6.3.2 Korak 2 – ohranimo najboljših šest	45
6.3.3 Korak 3 – ohranimo najboljše štiri	46
7 Relaksacija	48
7.1 Postopek relaksacije	48
7.1.1 Določitev tipa povezave	49
7.1.2 Obodnost povezave in sosedni obodne povezave	50
7.1.3 Mejnost povezave	50
7.1.4 Povezava z dvema močnima sosedoma	51
7.1.5 Pravila relaksacije	51
7.1.6 Primer relaksacije	52
8 Preiskovanje grafov	57
8.1 Definicija grafa	58

8.2	Strategija preiskovanja	58
8.3	Normalizacija poti	59
8.3.1	Normalizacija necikličnih poti.....	60
8.3.2	Normalizacija cikličnih poti	60
8.4	Seštevanje poti.....	60
8.5	Algoritem preiskovanja	61
8.6	Eliminacija poti.....	61
8.6.1	Eliminacija kratkih poti	61
8.6.2	Eliminacija podobnih poti	61
8.7	Primer preiskovanja grafov	62
9	Analiza rezultatov.....	65
9.1	Parametri.....	65
9.2	Slike	66
9.3	Obdelane slike	70
9.4	Analiza rezultatov.....	78
9.5	Predlogi za izboljšanje postopka	81
9.6	Alternativni načini obdelave slik celičnih jeder	83
9.7	Diagnosticiranje in ocenjevanje tumorjev v praksi	84
10	Zaključek	86
	Zahvala	87
	Viri.....	88
	Izjava o samostojnosti dela.....	91

Seznam slik

Slika 1.1 Celična jedra.....	2
Slika 2.1 Celice mlečnih žlez dojk. Uporabljeno je barvanje po Fleugnu.....	3
Slika 2.2 Barvanje po Pap metodi. Na sliki so celice materničnega vratu.	4
Slika 3.1 Postopki za odkrivanje objektov na sliki.....	6
Slika 3.2 Normalni vodi.....	7
Slika 3.3 Rakavi vodi.....	7
Slika 3.4 Štiriško drevo. Prikazani so trije nivoji [2].	9
Slika 3.5 Glajenje z drevesom s štirimi otroki (3 iteracije).....	9
Slika 3.6 Segmentacija na najnižjem nivoju.....	10
Slika 3.7 Prikaz segmentacije z uporabo algoritma Potopitev v vodo (water immersion algorithm) [2]. Barvanje po Pap metodi.	10
Slika 3.8 Osenčeno področje na sliki predstavlja območje zanimanja [6].	11
Slika 3.9 (a) Slika z zunanjim in notranjim krogom (b) Diskretizacija preiskovalnega prostora (c) Preiskovalni prostor nad celičnim jedrom [6].....	12
Slika 3.10 Popravek inicializacije (a) Položaj začetne konture je narobe lociran, zato je napačna tudi segmentacija. (b) Notranji krog je postavljen na novo lokacijo – na sredino očrtanega področja (resulting contour) iz slike 6a. (c) Pravilna segmentacija [6].....	14
Slika 3.11 Razvitje preiskovalnega prostora v mrežo [6].....	14
Slika 3.12 Preiskovalni prostor kot mreža - prikazane so točke, ki jih uporabljamo za izračun od začetnega vozlišča do tretjega vozlišča v začetni fazi [6].	16
Slika 3.13 Vpliv smernega gradienta: (a) brez smernega gradienta, (b) z orientacijo smernega gradienta, (c) brez smernega gradienta, (d) z orientacijo smernega gradienta.	17
Slika 3.14 Odstotek uspešnosti segmentacije v odvisnosti od parametra λ [4].....	18
Slika 3.15 Primer napačne segmentacije	19
Slika 3.16 Algoritem za detekcijo elips.....	21

Slika 3.17 Koraki predprocesiranja	22
Slika 3.18 Algoritem za segmentacijo celičnih jeder	23
Slika 5.1 Primer histograma za sliko celičnih jeder	28
Slika 5.2 Slika celičnih jeder	29
Slika 5.3 Prenizek prag (prag = 63)	30
Slika 5.4 Previsok prag (prag = 178)	30
Slika 5.5 Približek idealnega praga (prag = 97)	31
Slika 5.6 Majhne delce zavržemo (prag za velikost delcev = 200)	32
Slika 5.7 Gruče šuma	33
Slika 5.8 Jedra s svetlinami	34
Slika 5.9 Ista jedra kot na sliki 5.8, le da smo svetline spojili z jedrom	34
Slika 6.1 Dolžina jedra	37
Slika 6.2 Grupiranje: (a) bližina, (b) paralelnost, (c) kolinearnost [17]	38
Slika 6.3 Kriterij kotov	39
Slika 6.4 Primeri ocenjenih povezav s kriterijem kotov	40
Slika 6.5 Rob (smer je označena z rumeno barvo)	41
Slika 6.6 Povezave 'vsak z vsakim'	42
Slika 6.7 Karakteristične točke in nekatere razdalje med jedri	43
Slika 6.8 Shema roba skupka celičnih jeder	43
Slika 6.9 Razdalja med objekti	44
Slika 6.10 Izбира najkrajših povezav (prag=55): (a) samo segmentirani delci, (b) povezave med delci. Slika	44
Slika 6.11 Izбира najkrajših povezav (prag=44): (a) samo segmentirani delci, (b) povezave med delci.	45
Slika 6.12 Izberi 6 najboljših sliki 6.10 b smo odstranili povezave. Razlika je predvsem tam, kjer so jedra gosto posejana.	46
Slika 6.13 Nad sliko 6.12 smo izvedli še korak: izberi 4 najboljše	47
Slika 7.1 Tip povezav je (a) 2-3, (b) 1-2, (c) 0-1	49
Slika 7.2 Obodna povezava	50
Slika 7.3 Mejna povezava	51
Slika 7.4 Slika po 5 iteracijah	53
Slika 7.5 Slika po 20 iteracijah	53

Slika 7.6 Slika po 30 iteracijah.....	54
Slika 7.7 Slika po 40 iteracijah.....	54
Slika 7.8 Slika po 60 iteracijah.....	55
Slika 7.9 Končna slika po 100 iteracijah.....	56
Slika 8.1 Robovi skupkov celičnih jeder so zaobljeni in ne ostri.....	57
Slika 8.2 (a) Cikel, (b) Zanka	59
Slika 8.3 I in J smer	59
Slika 8.4 Brez eliminacije podobnih poti	63
Slika 8.5 Podobne poti eliminiramo	64
Slika 9.1 1341a	66
Slika 9.2 1341b	67
Slika 9.3 1341e	67
Slika 9.4 1343c	67
Slika 9.5 1442d	68
Slika 9.6 1442e	68
Slika 9.7 1442f.....	68
Slika 9.8 1442g.....	69
Slika 9.9 1438a	69
Slika 9.10 1434b.....	69
Slika 9.11 1442a	70
Slika 9.12 1442b.....	70
Slika 9.13 1442c1	70
Slika 9.14 1341a	71
Slika 9.15 1442b.....	72
Slika 9.16 1341e	73
Slika 9.17 1343b.....	74
Slika 9.18 1348a	75
Slika 9.19 1442a	76
Slika 9.20 1442b.....	77
Slika 9.21 1442d.....	78
Slika 9.22 Prekinitev roba	79
Slika 9.23 Zdrava vezivna jedra so manjša od rakavih žleznih jeder.....	80

Slika 9.24 Prerez jedra.....	81
Slika 9.25 Več prerezov združimo v 3D sliko.....	82
Slika 9.26 Sliko pomanjšamo, zgladimo z mediana filtrom in nato segmentiramo.	83
Slika 9.27 Vezivne celice z medceličnino kot nekakšne nitke obdajajo vod.	84

Analiza slik celičnih jeder z računalniškim vidom

Katarina Mele

Mentor: prof. dr. Aleš Leonardis, univ. dipl. ing

POVZETEK

Diplomska naloga obravnava segmentiranje celičnih jeder in odkrivanje grup, v katere se ta jedra združujejo. Kriterij za diagnosticiranje raka je namreč poleg lastnosti jeder tudi oblika grup. Predstavljenih je več postopkov za segmentacijo celičnih jeder.

Razvili smo postopek za odkrivanje robov celičnih tvorb. Pri tem uporabljamo postopke grupiranja s pomočjo požrešnega algoritma, relaksacije in preiskovanja grafov.

Na koncu je podanih nekaj primerov uporabe postopka za iskanje robov na slikah celičnih jeder žleznega tkiva dojk. Prikazane so razlike med normalnimi in rakastimi vodi, ki smo jih opazili v postopku odkrivanja robov vodov. Za izboljšanje samega postopka je nanizanih nekaj predlogov.

KLJUČNE BESEDE

računalniški vid, segmentacija, diagnosticiranje raka na dojkah, citologija, relaksacija, preiskovanje grafov, požrešni algoritem

An Analysis of Cell Nucleus Pictures Using Computer Vision

Katarina Mele

Supervisor: Prof. Aleš Leonardis

ABSTRACT

This work deals with cell nucleus segmentation and the edge detection of the clumps formed by nuclei. The fact is that it is both cell nucleus features and clump shapes that serve as cancer diagnosis criteria. In addition, the work includes several procedures of cell nucleus segmentation described in publications on computing.

The author has developed a method for the edge detection of nucleus clumps. It is based on grouping techniques with the greedy algorithm, relaxation and the graph search.

The analysis is followed by some examples showing the use of the edge detection method.

Differences between normal and malignant ducts are shown on the basis of some pictures of mammary glands. Finally, some improvements and future work extensions are suggested.

KEY WORDS

computer vision, segmentation, breast cancer, cytology, relaxation, graph search, greedy algorithm

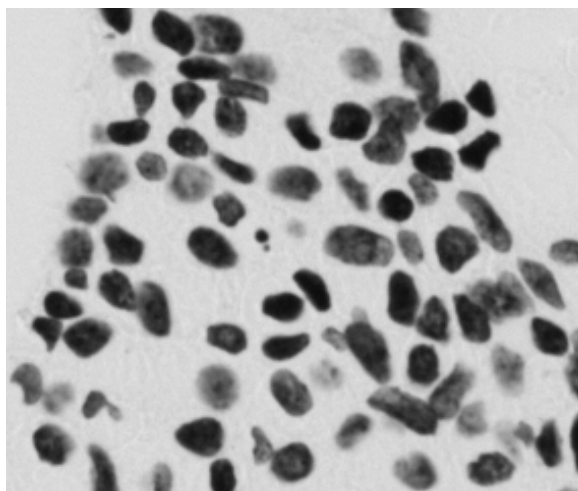
1 UVOD

Računalniški vid se uveljavlja povsod tam, kjer se pojavlja potreba po interpretaciji slik. Je nekakšen sinonim za analizo slik in prizorov ter za njihovo razumevanje. Kot multidisciplinarna disciplina se razvija kakih trideset let. V teh letih je prodril na področja umetne inteligence, robotike, procesiranja signalov, prepoznavanja vzorcev, psihologije, nevrologije, fotogrametrije in še na mnoga druga področja. V industriji se uporablja za nadzor nad industrijskimi procesi in njihovo kvaliteto, v varnostnih in nadzornih sistemih za detekcijo spremembe scene, v robotiki se z računalniškim vidom poskuša realizirati »robotove oči« itd. [17].

Pomembno vlogo ima računalniški vid tudi v medicini. Olajšuje načrtovanje operacij in diagnosticiranje. Eno izmed področij medicinske diagnostike, kjer uporabljajo računalniški vid, je diagnoza raka. Diagnoza raka s pomočjo računalniškega vida je tudi tema diplomske naloge.

Morfološka diagnoza je ena od najbolj ključnih diagnostičnih opredelitev pri obravnavi bolnikov s tumorji [13]. S pomočjo velikosti in oblike celičnih jeder, strukture in razporeditve kromatina¹ v jedru ter s pomočjo razmerja med jedrom in citoplazmo (slika 1.1) lahko z zelo veliko verjetnostjo sklepamo na rakavo obolenje. Obstajajo poročila o diagnosticiranju raka s pomočjo računalniškega vida na dojkah [19] in na materničnem vratu [6]. V omenjenih primerih sistem diagnosticiranja temelji na obliki in velikosti celičnih jeder ter na razmerju med jedrom in citoplazmo in ne na sami razporeditvi in grupiranju le-teh, kot smo poskušali mi.

¹ kromatin – v biol. ena izmed osnovnih sestavin jedra, ki se lepo obarva [18]



Slika 1.1 Celična jedra

Analiza slik navadno poteka v več korakih. Prvi, pri analizi celičnih jeter zelo pomemben korak, je nastanek slik. Z uporabo posebnih metod za barvanje preparatov dosežemo, da se jedra obarvajo temnejše kot okolica. Tako jedra glede na intenziteto slike jasno izstopajo iz okolice, kar precej pripomore k učinkovitosti algoritmov za obdelavo slik. Ko je preparat pripravljen, ga slikamo s svetlobnim mikroskopom, ki sliko ustrezno poveča in digitalizira. Digitalizirana slika gre navadno skozi serijo algoritmov, preden iz nje izluščimo koristne in uporabne podatke.

Diplomska naloga analizira slike celičnih jeter žleznega tkiva dojke. Celična jedra smo najprej segmentirali iz slike in nato poskušali ugotoviti, v kakšne oblike se združujejo. V bazi slik, ki smo jih imeli na razpolago za obdelavo, so se nahajali maligni¹, potencialno maligni in normalni vodi.

V naslednjem poglavju je podan kratek opis načina priprave preparatov in digitalnih slik. V tretjem poglavju pa sta predstavljeni dve metodi za segmentacijo celičnih jeter, ki jih najdemo v računalniški literaturi.

Poglavja, ki sledijo, opisujejo naš postopek za odkrivanje robov grup celičnih jeter. V četrtem poglavju je nazorna shema celotnega postopka, ki je natančno opisan od petega do vključno osmega poglavja.

¹ maligni – v med. zločest, zli, nevaren (nasprotno od benigni); benigni – v med. nenevaren, nedolžen [18]

Peto poglavje opisuje segmentacijo na principu upragovanja, ki smo jo uporabili v postopku. V šestem je predstavljen način ocenjevanja in izbire najboljših povezav med posameznimi segmentiranimi jedri. V sedmem poglavju je podan opis postopka relaksacije, v osmem pa poskušamo izbrane in dobro ocenjene povezave povezati v ustrezne poti s pomočjo preiskovanja grafov.

Slike, ki smo jih imeli na voljo, in rezultati so prikazani v devetem poglavju. V devetem poglavju pa je podanih tudi nekaj smernic za naprej in kritična ocena postopka. Deseto poglavje je kratek zaključek.

2 PRIPRAVA SLIK

Pripravo mikroskopskih slik za računalniško obdelavo lahko v grobem delimo na dve fazi:

- priprava preparata,
- zajemanje in digitalizacija slike.

2.1 PRIPRAVA PREPARATA

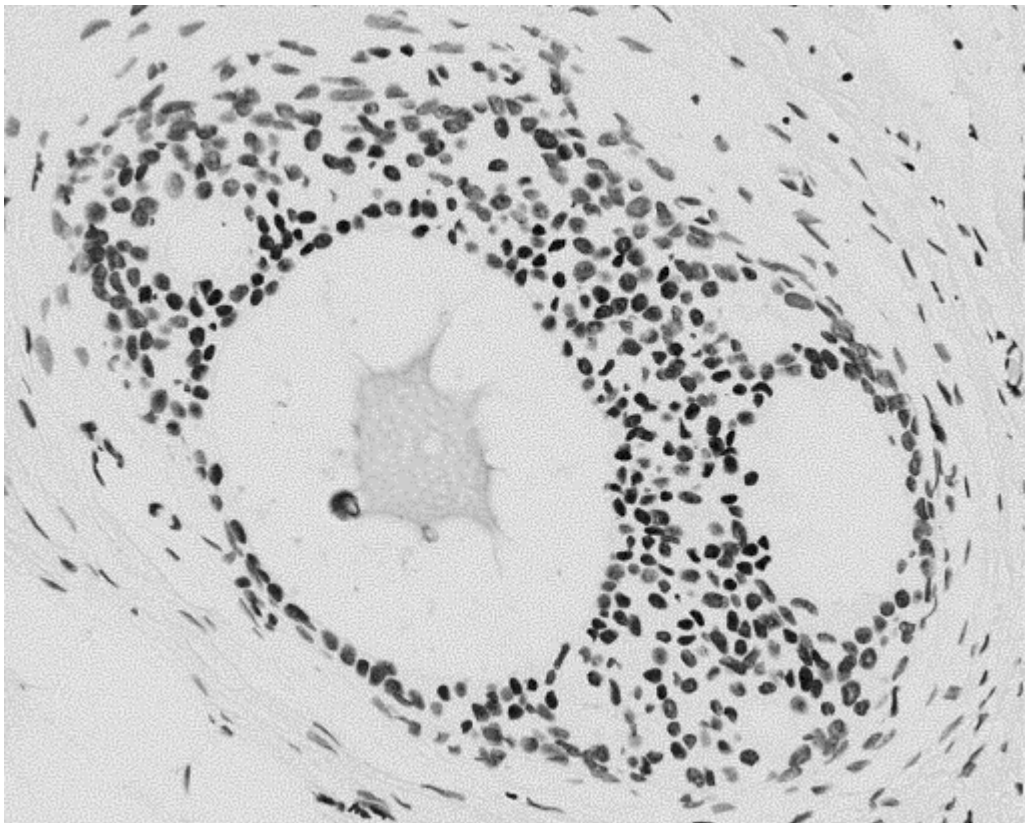
Opis priprave preparata je povzet po magistrski nalogi Pomen svetlih področij v celičnih jedrih, obarvanih po Fleugovi metodi [15].

Po nanosu celic na objektna stekelca preparate najprej osnovno fiksiramo. Fiksacija je postopek, ki preprečuje razpad celic ter ohranja njihovo strukturo. Za analizo s slikovnim citometrom, ki smo ga uporabljali tudi v našem primeru, je potrebno osnovno fiksirane preparate še dodatno fiksirati v raztopini, ki vsebuje formaldehid. S tem omilimo vpliv hidrolize, ki grobo deluje na zgradbo DNA.

Po dodatni fiksaciji preparate obarvamo. Pri metodi barvanja nukleinskih kislin se uporabljajo različna barvila. V današnjem času se za analize s slikovnim citometrom največkrat uporablja barvanje po Feulgnu s tioninom. Študije so pokazale, da pri barvanju s tioninom dobimo najboljšo resolucijo meritev DNA, najmanjšo variabilnost izmerjenih količin DNA in najmanjšo variabilnost med posameznimi serijami merjenja [15].

Pri barvanju po Feulgnu gre za specifično barvanje DNA. Tionin se namreč veže na DNA in tako postanejo objekti, ki te molekule vsebujejo, vidni. Ker se molekule DNA nahajajo v jedru celice, s tem dosežemo, da se jedra obarvajo temnejše. Barvilo se na DNA veže premo sorazmerno. Več molekul DNA vsebuje nek objekt, več tionina veže nase. Tako lahko kvantiziramo količino DNA v jedru.

Tudi v našem primeru smo uporabili barvanje po Fleugnu. Slike prikazujejo celice tkiva dojke, in sicer gre za tkivne rezine duktalnega¹ karcinoma² in-situ (slika 2.1). DCIS (ang. ductal carcinoma in-situ) je ena izmed oblik raka na dojki. Duktalni karcinom in situ (intraduktalni karcinom DCIS, neinvazivni karcinom) je karcinom, pri katerem karcinomske celice rastejo znotraj duktalnega sistema, ne preraščajo bazalne membrane in ne infiltrirajo okolnega vezivnega tkiva. Ta tip karcinoma nastopa v mnogih morfoloških variantah, ki so do nedavnega veljala le kot morfološke zanimivosti. V preteklosti je bil ta tip karcinoma redek in je zajemal le kakšnih 0,8 – 5% vseh karcinomov dojke; v obdobju mamografije pa se je istočasno s pogostejšim odkrivanjem majhnih tumorjev dojke povečalo tudi število primerov DCIS, ki zdaj v nekaterih serijah že dosega 15 - 20% vseh karcinomov . Gre torej za pomemben tip karcinoma dojke, ki je ta trenutek v središču zanimanja raziskovalcev na področju karcinoma dojke [13].

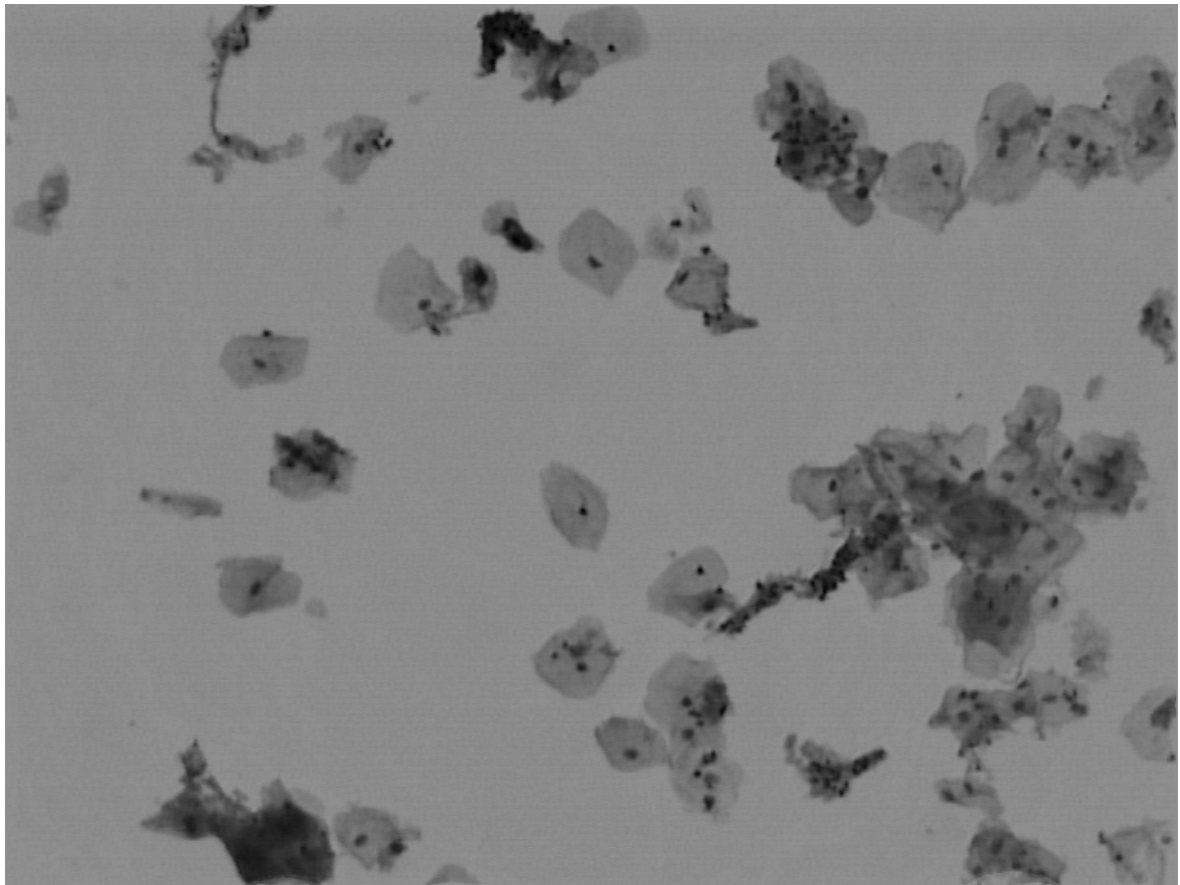


Slika 2.1 Celice mlečnih žlez dojke. Uporabljeno je barvanje po Fleugnu.

¹ duktus – v anatomiji (telesni) vod, odvodilo [18]

² karcinom – v med. rak, rakavo obolenje [18]

Naši preparati so bili obarvani po Fleugnu. V primeru analize slik brisa materničnega vratu s pomočjo metode aktivnih kontur [6], ki je opisana v drugem poglavju, pa so celične vzorce barvali po Papanicolaouvi metodi. To metodo barvanja se med drugim uporablja tudi za barvanje celic brisa materničnega vratu, ker omogoča optično svetlobno analizo celic. Metoda ne temelji na kvantitativnem barvanju. Obarva tako citoplazmo kot jedra. Pogosto se jo uporablja za barvanje celic materničnega vratu (slika 2.2).



Slika 2.2 Barvanje po Pap metodi. Na sliki so celice materničnega vratu.

2.2 ZAJEMANJE IN DIGITALIZACIJA SLIKE

Opis zajemanja in digitalizacije slike je povzet po magistrski nalogi Pomen svetlih področij v celičnih jedrih, obarvanih po Fleugovi metodi [15].

Zajemanje in digitalizacija slike sta bila narejena s pomočjo slikovnega citometra.

Slikovni citometer sestavljajo:

- digitalna kamera z visoko prostorsko in svetlobno ločljivostjo,
- svetlobni mikroskop skupaj z motorizirano mizico, pomično v x, y in z osi,
- robotska roka za nalaganje objektnih stekelc na motorizirano mizico svetlobnega mikroskopa,
- osebni računalnik, ki vsebuje celotno programsko opremo in ustrezne krmilnike za uspešno delovanje slikovnega citometra.

Delovanje slikovnega citometra lahko v grobem razdelimo na zajemanje slike, digitalizacijo slike in računalniško obdelavo slike. V konkretnem primeru je bil uporabljen program SLICE Interactive Image Acquisition, ki je v sklopu citometra Cyto-Savant™ (Oncometrics Imaging Corp., Vancouver, Canada).

Sliko zajemamo z digitalno kamero z visoko prostorsko in svetlobno ločljivostjo. Najpomembnejši del kamere je pretvornik slike (ang. image transducer) (MicroImager 1400. Xilinx Technol. Corp., Vancouver, BC, Canada). Pretvornik slike so razvili za delo v kvantitativni slikovni citometriji, saj sta njegovi najpomembnejši značilnosti visoka prostorska ($0,1 \mu m^2$) in svetlobna (256 sivin) ločljivost. Vsebuje CCD detektor slike (ang. Charge-Coupled Device) (KAF 124, Kodak, USA), ki je sestavljen iz $1,4 \times 10^6$ posameznih senzorskih elementov. Velikost posameznega senzorskega elementa meri $6,8 \mu m \times 6,8 \mu m$. Pravilno delovanje CCD detektorja, kakor tudi njegovo prilagajanje posebnim nalogam, je povezano z računalniškimi programi. CCD detektor se nahaja v primarni slikovni ravnini objektiva Plan Apo (Nikon). Objektiv ima 20-kratno povečavo in numerično aperturo 0,75. En senzor pokrije površino enega slikovnega elementa. Ko se jedrna slika projicira na zaznavno površino CCD detektorja, pokrije posamezen slikovni element površino $0,1 \mu m^2$ ($0,34 \mu m \times 0,34 \mu m$). Svetlobna ločljivost CCD detektorja je nastavljena na 256 (2^8) nivojev sivine [15].

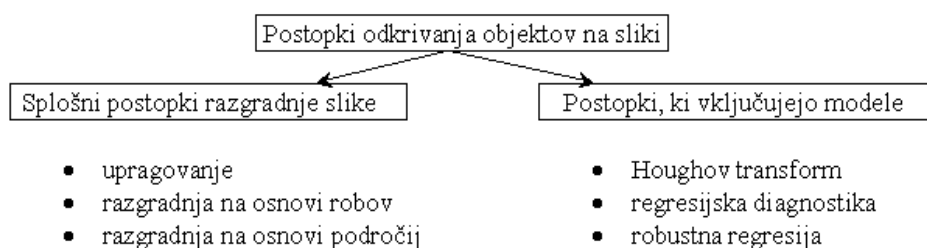
Slike, ki smo jih analizirali, so bile sivinske slike z 256 nivoji sivin, zapisane v bmp formatu, velikosti 1280 x 1024.

3 ODKRIVANJE OBJEKTOV NA SLIKI

Pri obdelavi slik celičnih jeder je najprej potrebno izvesti postopek odkrivanja objektov, v našem primeru so to celice in celična jedra.

Odkrivanje objektov (ang. object detection) na sliki je postopek, s katerim ločimo točke na sliki na tiste, ki tvorijo posamezne objekte, in tiste, ki tvorijo ozadje.

Postopke za odkrivanje objektov na sliki lahko delimo na splošne postopke razgradnje slike in na postopke, ki temeljijo na odkrivanju objektov z modeli (slika 3.1) [8].



Slika 3.1 Postopki za odkrivanje objektov na sliki

3.1 ODKRIVANJE CELIČNIH JEDER

Parametri za določanje diagnoze raka so:

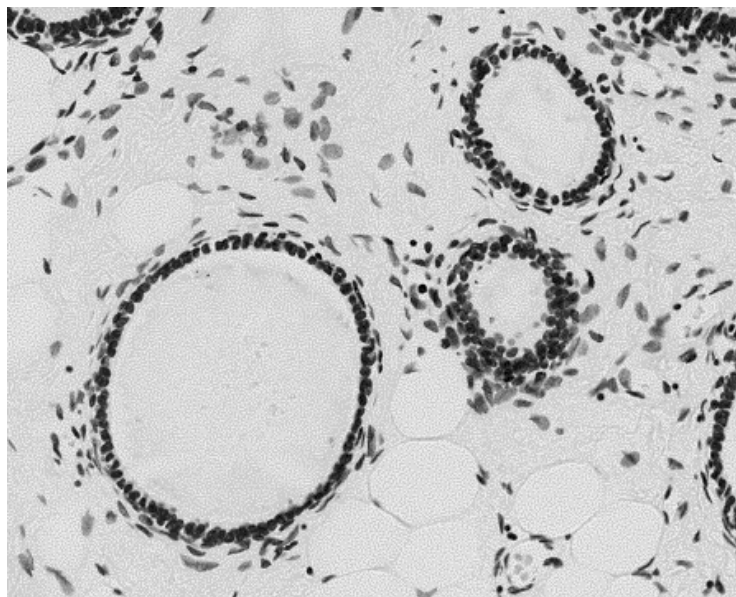
- velikost in oblika celičnih jeder ter njihova orientacija in pozicija v prostoru,
- struktura in razporeditev kromatina v jedru,
- razmerje med jedrom in citoplazmo.

V literaturi največkrat naletimo na računalniške sisteme, ki predlagajo diagnozo na podlagi nekaterih zgoraj navedenih parametrov. Primer takega sistema je Xcylt [14].

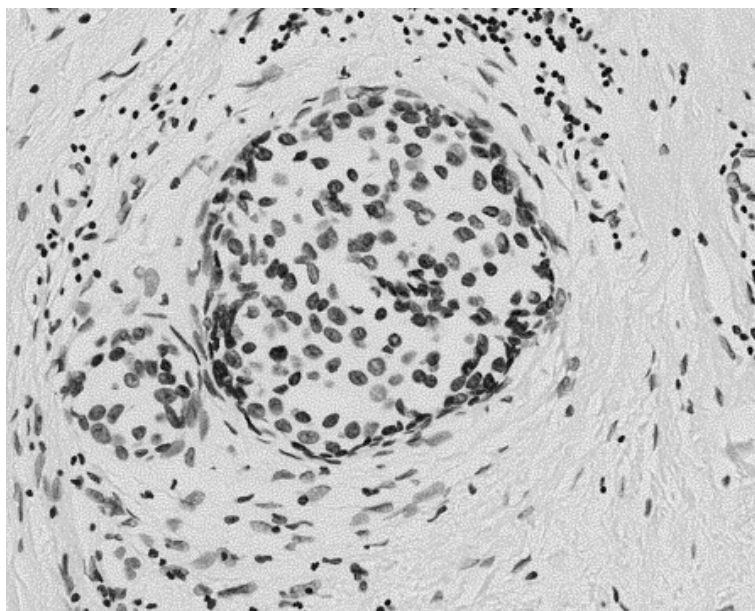
V vseh teh sistemih je zelo pomembna natančna segmentacija. To pa ni tako enostavno, kot je mogoče videti na prvi pogled, zato ni čudno, da so bili prav za segmentacijo celičnih jeder

razviti številni postopki. Različne metode opisujejo Kass, Witkin, Terzopoulos, MacAulay, McKenna in drugi [3], [6].

Mi smo poskušali ugotoviti, kakšno obliko skupkov tvorijo normalni in rakavi vodi (sliki 3.2 in 3.3). Pri naši analizi visoka stopnja natančnosti segmentacije ni bila ključnega pomena. Če smo hoteli določiti obliko vodov, smo morali najprej poiskati njihove robove. To je bil tudi naš končni cilj.



Slika 3.2 Normalni vodi



Slika 3.3 Rakavi vodi

V nadaljevanju sta najprej opisana dva postopka segmentacije celičnih jeder, kjer so obliko segmentiranih delov uporabljali za diagnosticiranje raka. To sta primera, ki ju lahko najdemo v računalniški literaturi. V petem poglavju pa je prikazan postopek segmentacije, ki smo ga implementirali v našem primeru. V prvih dveh primerih je segmentacija bistveno bolj natančen in zahteven postopek, saj so tu na diagnozo raka sklepali iz oblike segmentiranih jeder.

3.1.1 SEGMENTACIJA S POMOČJO METODE AKTIVNIH KONTUR

3.1.1.1 PRIMER S CELICAMI MATERNIČNEGA VRATU

Metodo aktivnih kontur so uporabljali za avtomatizacijo računanja različnih razmerij med citoplazmo in jedrom celic materničnega vratu in s tem klasifikacijo celic na rakave in zdrave.¹ Večje je razmerje, večja je možnost, da je celica prizadeta ali celo rakava.

Da bi dobili pravo razmerje, je zelo pomembna pravilna in natančna segmentacija citoplazme in jedra. Enostavne klasične metode segmentacije, kot je upragovanje, se v tem primeru ne obnesejo.

Stekelca z brisom materničnega vratu se najprej posname pri nizki ločljivosti z uporabo CCD kamere, nameščene na mikroskopu. Dobljene slike segmentirajo z uporabo algoritma, kot je Potopitev v vodo (Water immersion), da se določijo lokacije posameznih celic. Metoda Potopitev v vodo je na kratko opisana v naslednjem razdelku.

3.1.1.1.2 METODA POTOPITEV V VODO

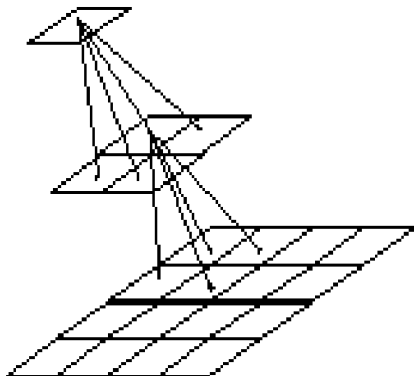
Metoda Potopitev v vodo, ki sta jo razvila Wilson in Span, je sestavljena iz treh korakov:

- **glajenje s pomočjo štiriškega drevesa**

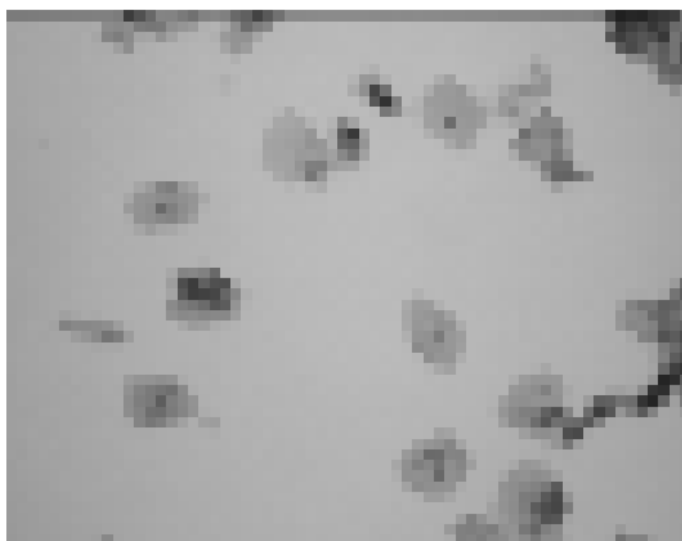
Vsak blok štirih slikovnih elementov določa vrednost staršu. Starše izračunamo kot povprečno vrednost vseh štirih otrok (slika 3.4). Če postopek ponovimo večkrat, dobimo več resolucij iste slike. Slika 3.5 prikazuje sliko celic materničnega vratu, ki smo jo zgladili s

¹ Segmentiranje celičnih jeder iz citoplazme je bilo v tem primeru opravljeno na slikah brisov, posnetih po konvencionalni Papanicolaoujevi metodi.

pomočjo štiriškega drevesa. Resolucijo slike torej zmanjšamo tako, da v eni iteraciji štirim sosednjim slikovnim elementom priredimo vrednost njihovega povprečja.



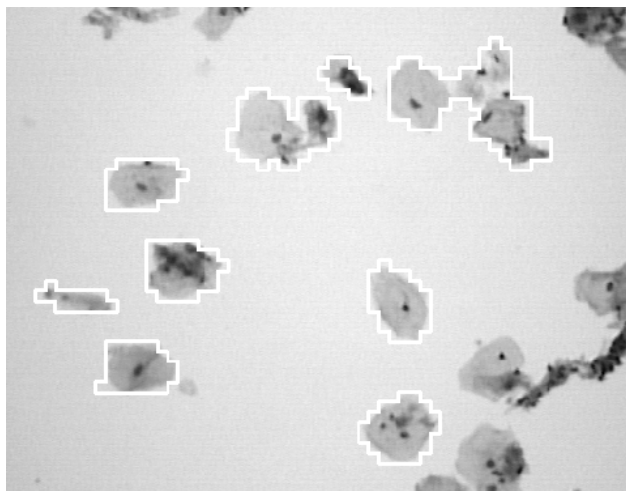
Slika 3.4 Štiriško drevo. Prikazani so trije nivoji [2].



Slika 3.5 Glajenje z drevesom s štirimi otroki (3 iteracije)

- **klasifikacija na najnižjem nivoju**

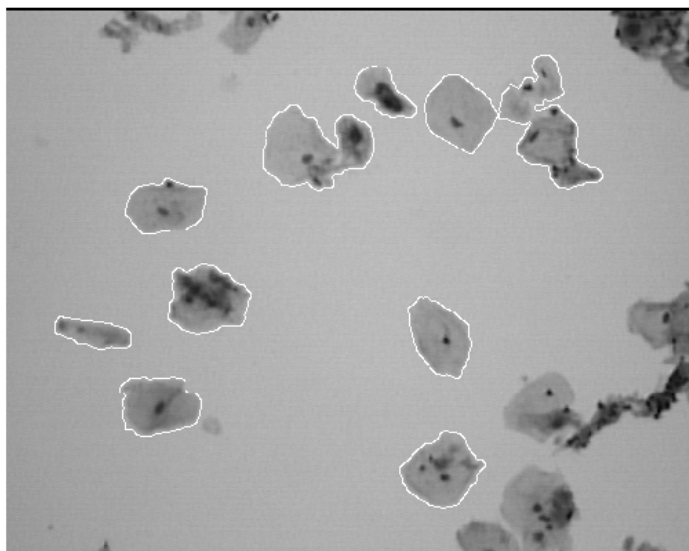
Na sliki z najmanjšo resolucijo določimo robove celic (slika 3.6). Sivinske slike si lahko predstavljamo kot zemljevid, kjer celice predstavljajo vzpetine. Če ta zemljevid potopimo v vodo, na površju ostanejo le vzpetine – segmentirana jedra. Iz te primerjave izhaja tudi ime algoritma – Potopitev v vodo.



Slika 3.6 Segmentacija na najnižjem nivoju

- **ponovna določitev roba**

V nadaljnjih ponavljanjih določitve robov si pomagamo z drevesom s štirimi otroki. Rob na slikah z boljšo resolucijo ponovno določamo le tam, kjer smo robove našli že na slikah z manjšo resolucijo. Slika 3.7 prikazuje rezultat postopka Potopitev v vodo.



Slika 3.7 Prikaz segmentacije z uporabo algoritma Potopitev v vodo (water immersion algorithm) [2].

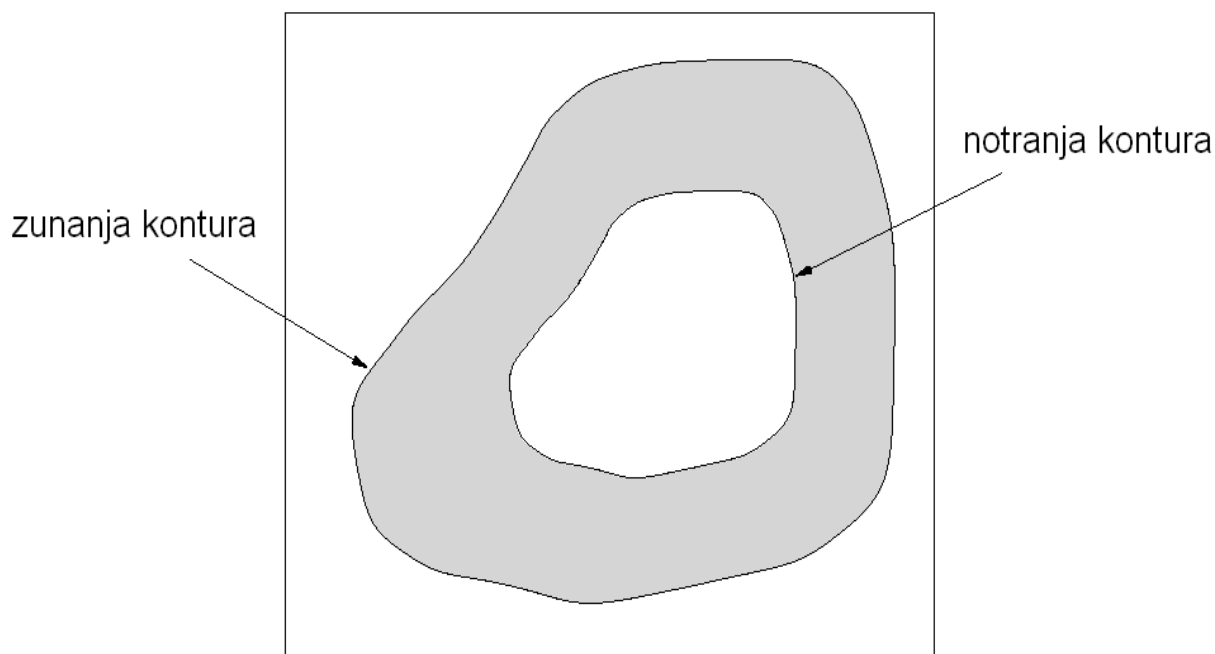
Barvanje po Pap metodi.

Ko so koordinate celic določene, posamezne celice posnamemo z močnimi povečevalnimi lečami, da dobimo slike, primerne za obdelavo z metodo aktivnih kontur.

3.1.1.1.3 IMPLEMENTACIJA METODE AKTIVNIH KONTUR

Poleg same metode aktivnih kontur bomo predstavili tudi značilnosti implementacije metode, ki je uporabna za raziskave celičnih jeder materničnega vratu.

Znotraj slike (slika 3.8) se najprej določi območje zanimanja, katerega oblika, velikost in položaj so pogojeni s predznanjem o raziskovanih objektih s slike. Lastnosti območja določajo iskalni prostor za metodo aktivnih kontur. Njena naloga je, da ovrednoti vsako možno zaprto konturo, ki se ujame v iskalni prostor, omejen z notranjo in zunanjo konturo.

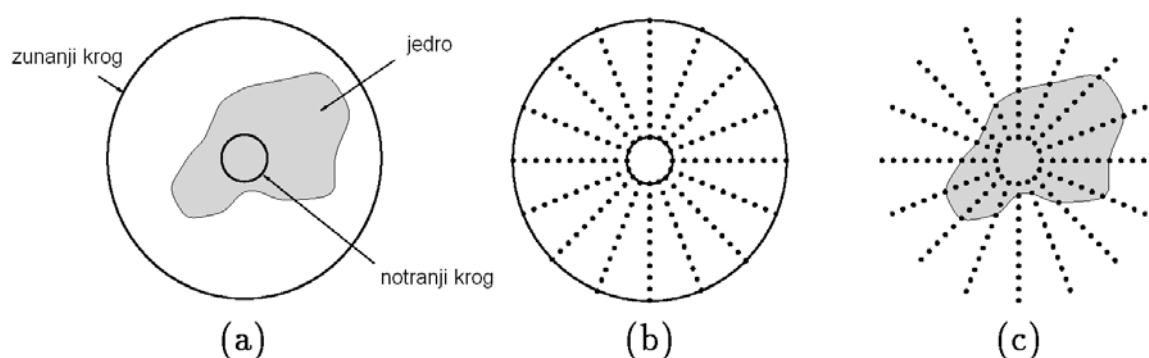


Slika 3.8 Osenčeno področje na sliki predstavlja območje zanimanja [6].

Z namenom, da omejimo število vseh možnih kontur, se iskalni prostor razdeli na diskretno mrežo, ki jo dobimo, če diskretiziramo notranjo in zunanjo konturo in dobljeno število daljic, ki ju povezujejo. Za vsako konturo, ki leži na točkah mreže iskalnega prostora, se izračuna cena, ki je lahko izražena z gladkostjo konture, z dejstvom kako močno leži kontura na slikovnih elementih z visokim slikovnim gradientom, ali pa določimo utež s kakšno drugo

cenovno funkcijo, odvisno od narave aplikacije. Algoritem konvergira proti rešitvi. Kot rešitev dobimo konturo z najmanjšo ceno.

3.1.1.1.3.1 KONSTRUKCIJA PREISKOVALNEGA PROSTORA



Slika 3.9 (a) Slika z zunanjim in notranjim krogom (b) Diskretizacija preiskovalnega prostora (c) Preiskovalni prostor nad celičnim jedrom [6]

Glede na to, da so celična jedra v splošnem »eliptične« oblike, lahko v najbolj enostavnem primeru konture, ki omejujejo iskalni prostor, očrtamo s pomočjo dveh koncentričnih krogov (slika 3.9a), diskretiziranih v dve množici N -tih točk. Premera zunanje in notranje konture so prvotno nastavili na znane vrednosti velikosti največjega in najmanjšega celičnega jedra pri izbrani ločljivosti mikroskopa. Daljice, ki povezujejo soležne točke zunanje in notranje konture, so razdelili na M točk, s čimer dobimo diskretni iskalni prostor v obliki matrike $N \times M$ točk (sliki 3.9 b in 3.9 c). N je število daljic.

3.1.1.1.3.2 INICIALIZACIJA

Slike se najprej grobo segmentira, da dobimo zunanje in notranje konture, ki v celoti ležijo zunaj in znotraj celičnega jedra. To je precej enostavnejši problem v primerjavi z natančnim očrtanjem celičnega jedra. Obstaja več različnih načinov inicializacije zunanjih in notranjih kontur, ki so se izkazali za uspešne.

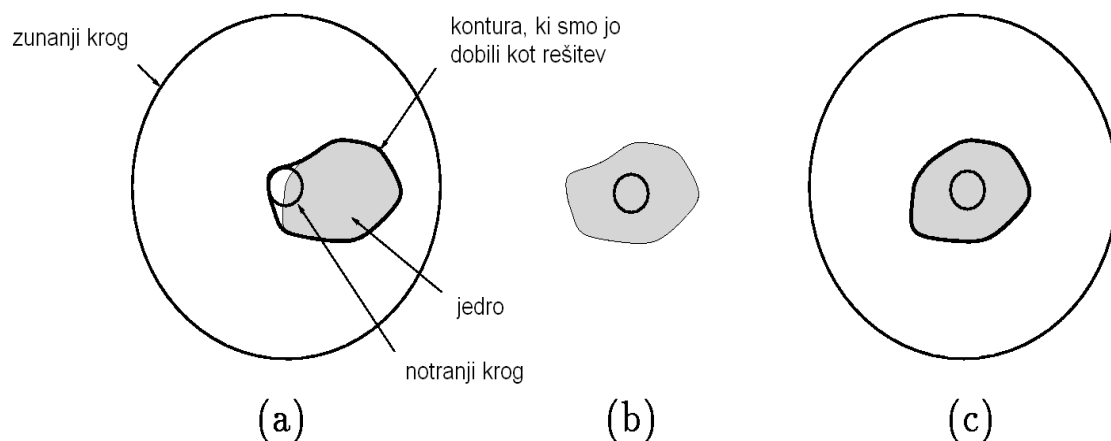
Ker so jedra temnejša kot obkrožujoča citoplazma, se je algoritem konvergirajočih kvadratov (converging squares) izkazal kot najbolj obetaven za hitro lociranje najtemnejše točke znotraj najtemnejšega dela slike [6].

Enostavne pragovne metode z minimalno dodatno obdelavo so tudi uspešne pri lociranju točke znotraj jedra, kamor lahko postavimo centra obeh kontur.

Da zagotovimo, da mejni konturi nikjer ne prečkata roba celičnega jedra, kar bi pomenilo nezaželeno izločitev dela roba jedra iz iskalnega prostora (slika 3.10 a), je bila razvita tehnika popravljanja inicializacijskih parametrov, ki za vse možne primere vrne pravilno inicializacijo (slika 3.10 b in 3.10 c). Metodo lahko povzamemo v šestih točkah:

1. *Po eni izmed omenjenih metod poišči točko znotraj jedra.*
2. *Postavi središče zunanje in notranje konture v dobljeno točko.*
3. *Izvedi segmentacijo po metodi aktivnih kontur (metoda aktivnih kontur je opisana v naslednjem razdelku).*
4. *Izračunaj središče izračunane površine.*
5. *Premakni središči zunanje in notranje konture v novo točko, izračunano v koraku 4.*
6. *Ponavljaj koraka od 3 do 5, dokler se očrtana površina spreminja.*

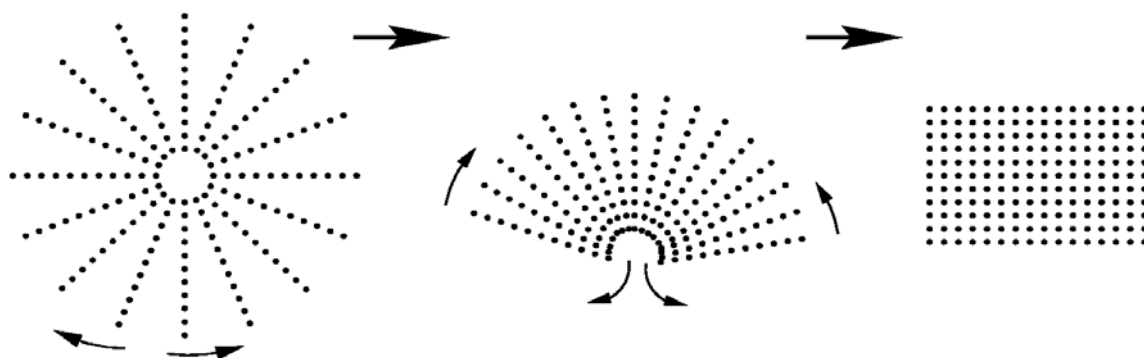
Pokazalo se je, da ta metoda tudi v ekstremnih primerih, ko je kontura centrirana na rob jedra, uspešno premakne središče konture v bližino središča jedra.



Slika 3.10 Popravek inicializacije (a) Položaj začetne konture je narobe lociran, zato je napačna tudi segmentacija. (b) Notranji krog je postavljen na novo lokacijo – na sredino očrtanega področja (resulting contour) iz slike 6a. (c) Pravilna segmentacija [6]

3.1.1.1.3.3 OCENA KONTURE

Da bi dobili rešitev, ki minimizira neko cenovno funkcijo, je potrebno oceniti vsako konturo, ki leži znotraj iskalnega prostora. Če v mislih iskalni prostor v neki točki odvijemo (slika 3.11), lahko gledamo na problem kot iskanje odprte konture z določeno začetno in končno točko. Iskalno področje tako postane mreža, po kateri lahko izvajamo izredno učinkovit algoritem Viterbi [6] za iskanje najcenejše poti.



Slika 3.11 Razvitje preiskovalnega prostora v mrežo [6]

Algoritem je poseben primer dinamičnega programiranja in uporablja princip optimalnosti, ki pravi: Če gre optimalna pot iz točke a v točko c skozi točko b, potem je odsek poti od točke b do točke c hkrati tudi optimalna pot od točke b do točke c. Zato je dovolj, da za vsako vozlišče v mreži ohranjamo eno samo najboljšo pot do tega vozlišča. S tem omejimo število ohranjenih poti katerekoli točke na M, namesto $M \times N$, kot bi to zahtevalo izčrpno preiskovanje. Problem je razdeljen na stopnje (stolpce). Na vsaki stopnji izračunamo vrednostno funkcijo po formuli:

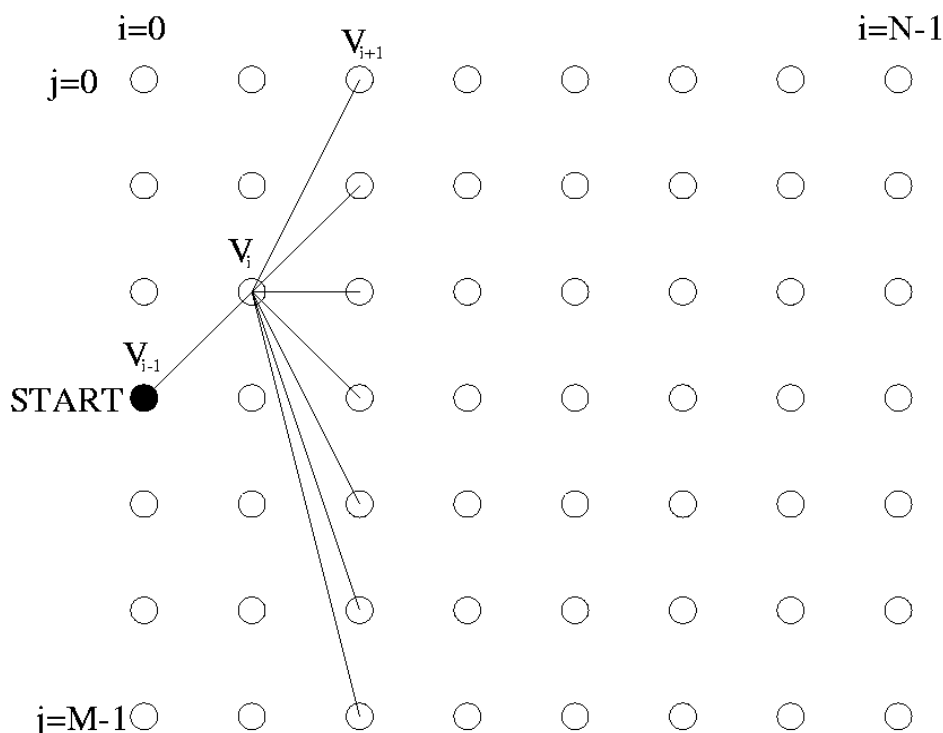
$$S_i(v_{i+1}, v_i) = \min[S_{i-1}(v_i, v_{i-1}) + \lambda E_{\text{int}}(v_{i-1}, v_i, v_{i+1}) + (1 - \lambda)E_{\text{ext}}(v_i)], \quad (3.1)$$

kjer je

$$E_{\text{int}} = \left(\frac{v_{i+1} - 2v_i + v_{i-1}}{v_{i+1} - v_{i-1}} \right)^2. \quad (3.2)$$

Notranja energija predstavlja gladkost krivulje, zunanja pa je definirana z gradientom intenzitete slike v točki v_i . Regularizacijski parameter λ uravnoteži učinek gladkosti notranje energije E_{int} z učinkom energije slike E_{ext} . Nizka vrednost λ povzroči, da so izbrane točke z največjim gradientom intenzitete slike. Take točke pogosto najdemo tudi v samem jedru, kar je posledica različno intenzivno obarvanih delov kromatina. Visoka vrednost parametra λ pa povzroči, da algoritem ignorira informacijo o gradientu in končna kontura bo imela najbolj gladko obliko, ki jo iskalni prostor dovoli, to je krog. Vrednost λ torej izberemo med tema dvema ekstremoma. Optimalna vrednost parametra pa je odvisna od narave same slike. Ker je funkcija ukrivljenosti odvisna od treh točk, je cenovna funkcija funkcija točk: v_i , v_{i-1} in v_{i+1} (slika 3.12), pri čemer je točka v_i rezultat izbire optimalne točke iz predhodne stopnje. V končni stopnji vzamemo vozlišče z najmanjšo ceno in proglasimo pot do njega za najcenejšo konturo, kar je končna rešitev.

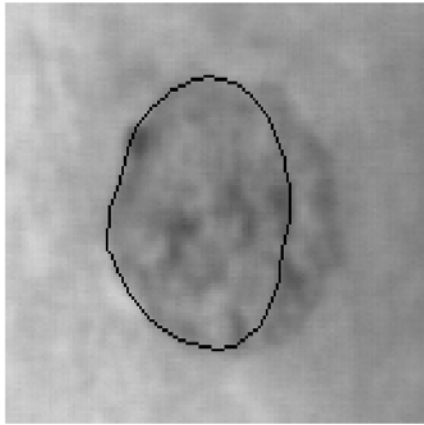
Ta metoda poišče najcenejšo odprto konturo v iskalnem prostoru, pri čemer sta začetna in končna točka nedoločeni. Medtem ko začetna in končna točka morda ne ležita na globalnemu minimumu zaprte konture, je sredina odprte konture zelo blizu globalnega minimuma. To je tudi razlog, da je Gunn [6] predlagal, da se izbereta srednji dve točki rešitve iz prvega iskanja kot začetna in končna točka za drugo iskanje. S tem se izognemo ponavljanju opisanega postopka za vseh M^2 možnih kombinacij začetnih in končnih točk.



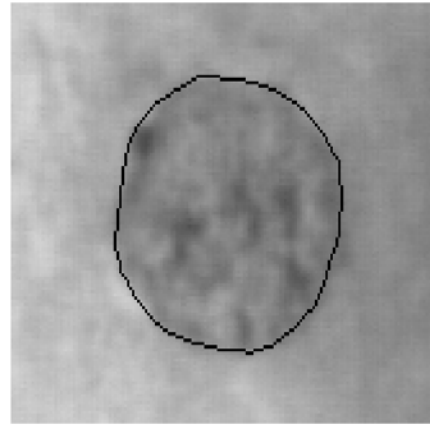
Slika 3.12 Preiskovalni prostor kot mreža - prikazane so točke, ki jih uporabljamo za izračun od začetnega vozlišča do tretjega vozlišča v začetni fazi [6].

3.1.1.1.3.4 SMERNI GRADIENT IN IZBIRA PARAMETRA

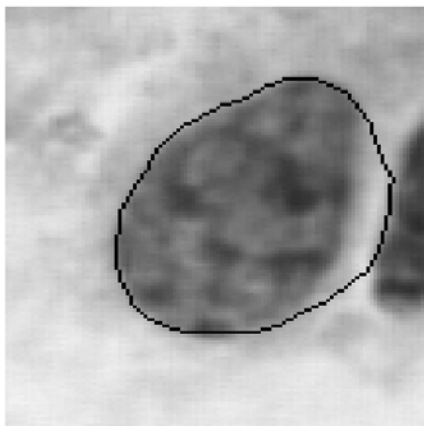
Prvi rezultati [4] so pokazali občutljivost metode na šibek gradient intenzitete vzdolž roba celičnega jedra. V takih primerih je faktor ukrivljenosti preveč vplival na obliko konture, kar je pogosto povzročilo, da je končna rešitev ležala znotraj celičnega jedra. Temu problemu se izognemo, če vpeljemo smerni gradient, orientiran proti središču jedra (slika 3.13 a, 3.13 b). S pomočjo usmerjevalnega gradienta rešimo tudi primer nepravilne segmentacije zaradi arefaktov, ki ležijo v bližini jedra. Brez usmerjevalne funkcije bi temni artefakti privlačili konturo zaradi močnejšega gradienta (slika 3.13 c). Če pa gradient izračunamo v smeri proti središču jedra in upoštevamo spremembe samo iz svetlejših v temnejše dele (ko se pomikamo proti središču), omogočimo, da algoritem ignorira spremembe iz temnega na svetlo (slika 3.13 d). S poizkušanjem različnih vrednosti parametra λ na manjši množici testnih slik se je vrednost 0,8 izkazala za optimalno vrednost parametra λ (slika 3.14).



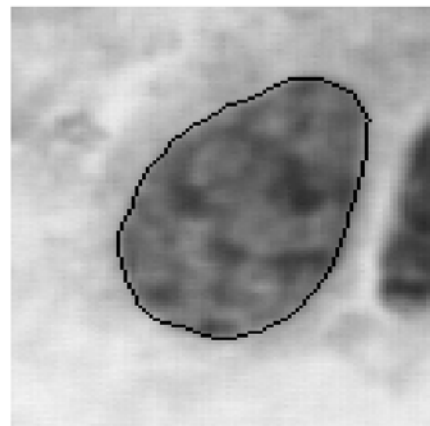
(a)



(b)

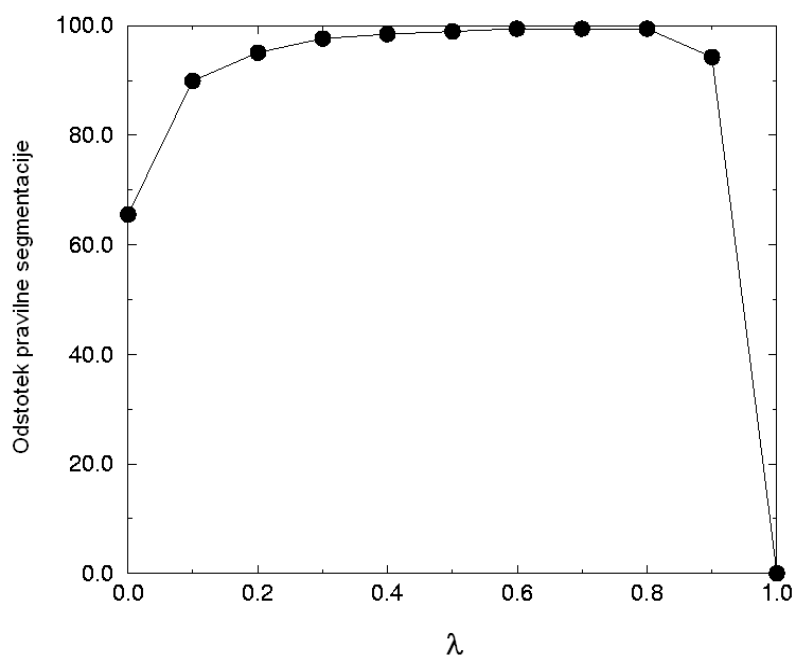


(c)



(d)

Slika 3.13 Vpliv smerne gradienta: (a) brez smerne gradienta, (b) z orientacijo smerne gradienta, (c) brez smerne gradienta, (d) z orientacijo smerne gradienta.



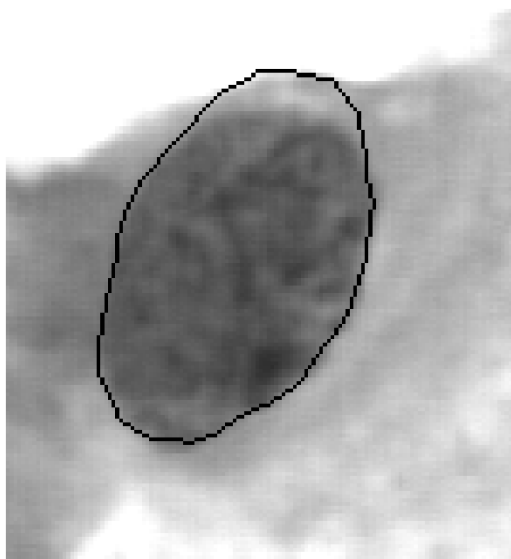
Slika 3.14 Odstotek uspešnosti segmentacije v odvisnosti od parametra λ [4]

3.1.1.2 LASTNOSTI METODE AKTIVNIH KONTUR

Rezultat je pokazal ustreznost algoritma za segmentacijo celičnega jedra pri slikah, pridobljenih s pomočjo metode Pap. Na tak način smo pokazali neobčutljivost algoritma na razne artefakte in na izbiro začetne inicializacije. Algoritem je tudi relativno hiter. Rezultati kažejo, da je za približno eno sliko velikosti 128x128 slikovnih elementov porabil eno sekundo. Uporabljen je bil multi-user DEC Alpha 255MH sistem. Pokazala se je še ena prednost uporabe algoritma Viterbij, zanj je bil namreč razvit poseben hardver, ki izkorišča paralelizem.

Pojavila sta se dva vzroka napak:

1. Nekatere slike so bile napačno segmentiranje, ker je jedro ležalo preblizu meje citoplazme (slika 3.15). Meja citoplazma-ozadje je imela večji kontrast kot meja jedro-citoplazma. Primer take napačne segmentacije je prikazan na sliki 3.15.



Slika 3.15 Primer napačne segmentacije

2. Nekaj napačno segmentiranih slik je bilo zaradi neustrezne izbire parametra λ . Ko so spreminjali parameter λ , samo treh slik izmed 26 niso mogli natančno segmentirati.

Pri ostalih slikah pa so se pojavile napake zaradi napačne rabe mikroskopa (fokus, osvetlitev itd.).

Seveda je treba povedati, da so nekatere slike težko opredeljive celo za človeško oko.

Zgoraj opisane napake se da delno tudi odpraviti.

Napake prvega tipa – (ozadje-citoplazma) lahko preprečimo, saj natančno vemo, kje se nahaja meja ozadje-citoplazma. Ostane nam še problem parametra λ , ki pa ga lahko izberemo po posebnem postopku, s katerim izboljšamo natančnost metode. Slike razdelimo v posebne težavnostne razrede in na podlagi teh razredov ustrezno izberemo parameter λ [4].

Kompleksnost algoritma reguliramo še s pomočjo parametrov M in N . Če vzamemo manj daljic (manjši M) in jih razdelimo na manj delov (manjši N), je tudi preiskovalni prostor velikosti $M \times N$ manjši.

3.1.2 SEGMENTACIJA S POMOČJO HOUGHOVEGA TRANSFORMA IN AKTIVNIH KONTUR

Segmentacijo s pomočjo Houghovega transforma pri predpostavki, da so jedra eliptične oblike, so uporabljali za prepoznavanje raka na dojkah [19]. Tudi v tem primeru so opazovali obliko jeder in ne oblike skupkov, ki jih ta jedra tvorijo.

3.1.2.1 HOUGHOV TRANSFORM

Houghov transform (HT) oz. različice splošnega Houghovega transforma (generalized Hough Transform - GHT) je tipičen primer algoritma za iskanje objektov na sliki. HT je robusten in zelo učinkovit pri iskanju poljubnih, toda vnaprej določenih oblik na sliki. Objekti, ki jih želimo detektirati, so predstavljeni kot parametrične krivulje. Osnovna ideja HT je preslikava med prostorom na sliki in parametričnim prostorom. Vsako točko, ki na sliki predstavlja rob nekega objekta, preslikamo v parametrični prostor tako, da v parametričnem prostoru označimo vse take točke, katerih parametri določajo krivuljo, ki gre skozi dano točko roba na sliki. Števce vseh točk v parametričnem prostoru, ki ustrezajo temu pogoju, povečamo. Ko na tak način preslikamo v parametrični prostor vse robne točke s slike, poiščemo lokalne maksimume v parametričnem prostoru. Točke, ki predstavljajo lokalne maksimume, določajo parametre ustreznih oblik, ki jih najdemo na sliki.

Ker krivulja z n parametri zahteva n -dimenzionalen prostor, detektiranje elips (jedra predstavimo kot eliptične objekte) zahteva 5-dimenzionalen prostor: dve dimenziji za velikost slike ($w \times h$ - dolžina x višina v slikovnih elementih), dve za velikost objekta (a in b - polosi elipse) in eno za orientacijo elipse (θ). Potreben spominski prostor ima torej dimenzije $wh|a||b||\theta|$. Tak algoritem je precej počasen in prostorsko zelo zahteven. Da bi zmanjšali prostorsko zahtevnost, iterativni GHT (razširitev GHT-ja) uporablja le tri prostorske parametre (a, b in θ). Podrobneje je ta postopek opisan v [14].

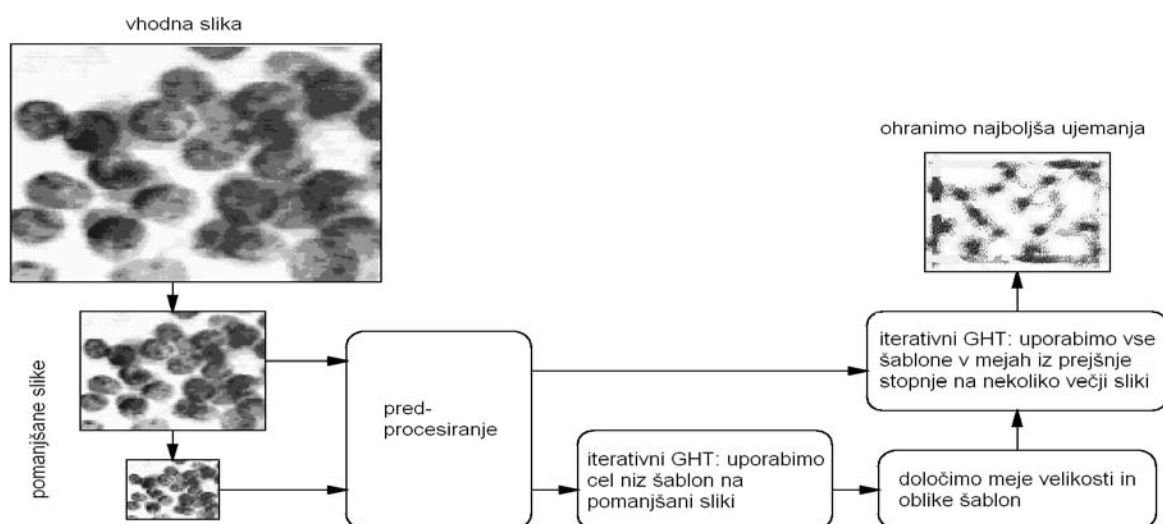
3.1.2.2 METODA S POMOČJO HT

Metoda je sestavljena iz dveh korakov. V prvem uporabi sekvenco iterativnih GHT za detekcijo oblik in pozicij elips, v drugem koraku uporabi podatke iz prvega koraka in s pomočjo kač natančno segmentira jedra.

3.1.2.2.2 DETEKCIJA ELIPS

V tem koraku uporabljajo dva iterativna GHT-ja, enega, da pridobijo informacije o velikosti elips, in drugega za detekcijo jeter.

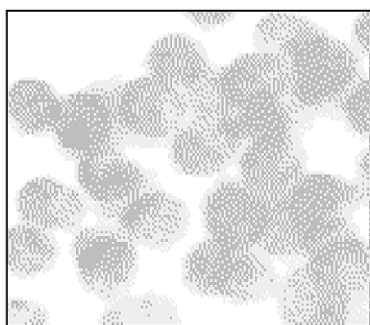
Največ časa se porabi pri iskanju primerne šablone, ki je določena s točko v parametričnem prostoru in bi utegnila ustrezati posameznemu jedru. Ker se jedra po velikosti med seboj ne razlikujejo zelo veliko, je jeder različnih velikosti bistveno manj, kot je vseh šablon, ki jih generiramo. Iskanje elips neustreznih velikosti na sliki je torej odvečna poraba časa. Da bi zmanjšali število šablon, moramo vedeti, kako velika jedra se nahajajo na sliki. To informacijo pridobimo s pomočjo prvega iterativnega GHT-ja, ki ga izvajamo na zmanjšani sliki. Sliko zmanjšamo zato, da s tem zmanjšamo tudi prostor parametrov w in h . Naloga prvega GHT-ja je torej najti meje a in b , v katerih se nahajajo vsa jedra na sliki. Oblike in velikosti jeder pa poišče drugi iterativni GHT.



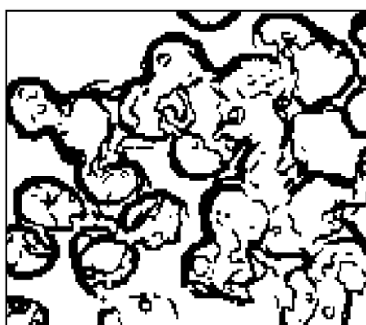
Slika 3.16 Algoritem za detekcijo elips

Na sliki (3.16) je prikazan algoritem 1. koraka. Predprocesiranje najprej izvršimo na pomanjšanih slikah. Najprej zgladimo sliko z mediana filtrom, da zmanjšamo morebitne posledice pomanjkljivega vzorčenja. Nato s Sobelovim detektorjem poiščemo robove in njihovo smer. Zadnji korak v predprocesiranju pa je tanjšanje robov. Postopek predprocesiranja je prikazan na sliki 3.17.

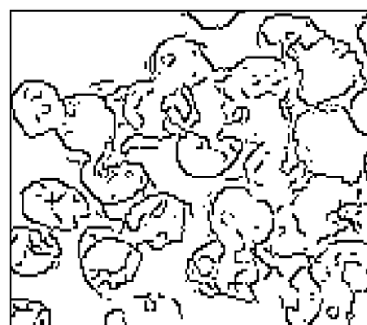
Slike najprej pošljemo skozi postopek predprocesiranja in nato skozi prvi iterativni GHT. Prvi iterativni GHT uporabimo na 4x pomanjšani originalni sliki. Za vsako točko na sliki ohranimo le najboljše ujemanje s šablonami, saj nas zanima le najboljše ujemanje med šablono in jedrom na sliki. Te najboljše vrednosti shranimo v globalni spremenljivki, ki za vsako točko na sliki ohranja vrednosti a , b , obliko elipse (kot) in stopnjo ujemanja. Izkaže se, da ta spremenljivka po končanem postopku vsebuje le nekaj različnih šablon, torej različnih točk iz parametričnega prostora. V nadaljevanju se omejimo na te šablone. Izvedemo drugi iterativni GHT na nekoliko večji sliki (originalno zmanjšamo na polovico). To je nekakšen kompromis med natančnostjo in zahtevnostjo postopka.



(a) po obdelavi z mediana filtrom



(b) po obdelavi s Sobelovim detektorjem robov



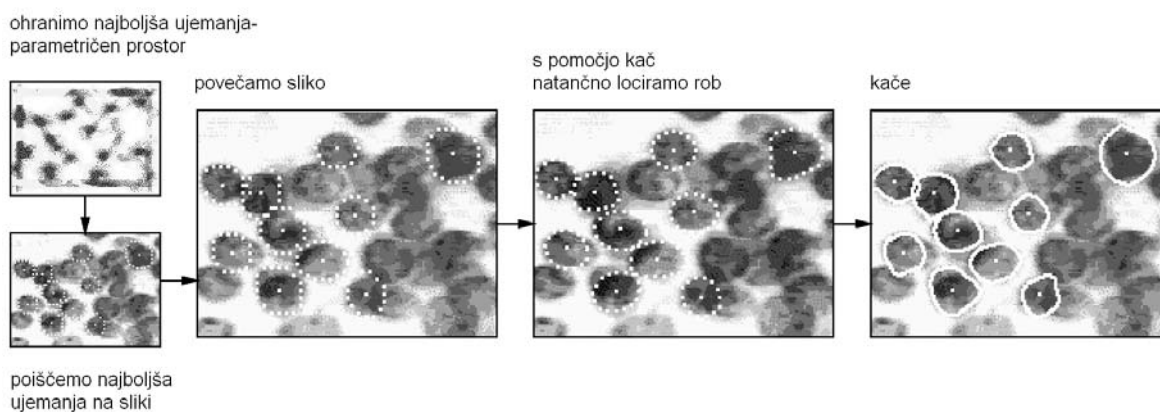
(c) tanjšanje robov

Slika 3.17 Koraki predprocesiranja

3.1.2.2.3 DOLOČITEV LOKACIJE IN OBLIKE JEDER TER NATANČNA SEGMENTACIJA S POMOČJO AKTIVNIH KONTUR

Po drugem iterativnem GHT-ju poiščemo lokalne maksimume v parametričnem prostoru. Tako najdemo lokacijo vseh najboljših ujemanj jeder in tudi obliko šablone, ki se najlepše prilega jedru. Ker smo iterativni GHT izvajali na pomanjšani sliki, moramo ustrezno skalirati pozicije in oblike najboljših ujemanj. Posebne krivulje, kače, kot začetne točke uporabljajo skalirane pozicije vzdolž šablon, ki jih določili s pomočjo GHT. S pomočjo kač bolj fino določimo rob jeder. Na sliki 3.18 je prikaza shema opisanega algoritma za segmentacijo celičnih jeder.

Metoda se je izkazala kot precej robustna in točna. Seveda pa vseh robov jeder tudi na tak način ne določimo s 100% natančnostjo. Je dovolj zanesljiva, da z njeno pomočjo izluščijo komponente posameznih jeder, ki so ključne za diagnozo raka na dojkah in njen razvoj [14].



Slika 3.18 Algoritem za segmentacijo celičnih jeder

4 ORIS POSTOPKA ZA ISKANJE ROBOV

V tem poglavju je shema metode, ki smo jo razvili za iskanje robov grup, v katere se združujejo celična jedra. Posamezni koraki so natančneje predstavljeni v naslednjih poglavjih.

Prvi korak je priprava slik. Ta korak je opisan v drugem poglavju. Sledi segmentacija celičnih jeder. S pomočjo segmentacije se omejimo na jedra, s pomočjo katerih poskušamo v kasnejših korakih določiti robove skupkov.

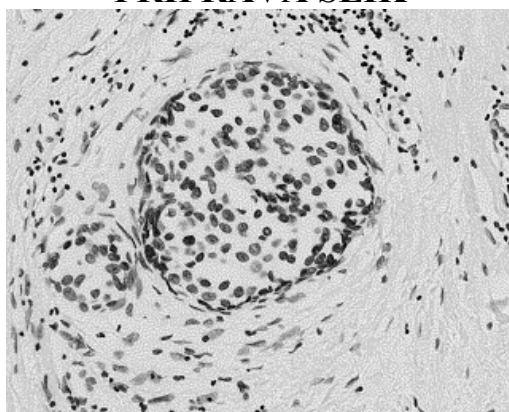
V koraku izbira in ocena najboljših povezav se omejimo le na manjšo množico povezav, ki povezujejo jedra med seboj. Množica povezav, kjer bi bilo vsako jedro povezano z vsakim, ni primerna za konkreten postopek.

Relaksacija je postopek, ki iterativno ocenjuje posamezne povezave. Na koncu dobro ocenjene povezave ohrani, ostale pa zavrže.

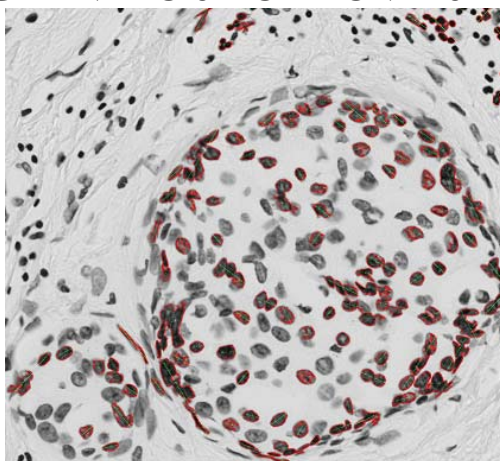
Sledi preiskovanje grafov. Namen tega koraka je poiskati dolge in zaobljene poti skozi graf, ki ga določajo dobro ocenjene povezave iz postopka relaksacije.

Shema postopka je prikazana na sliki 4.1.

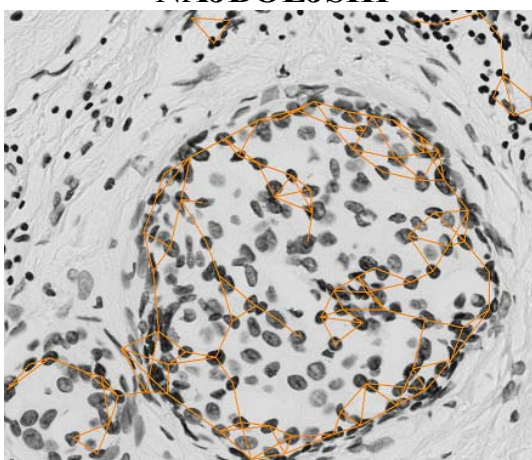
PRIPRAVA SLIK

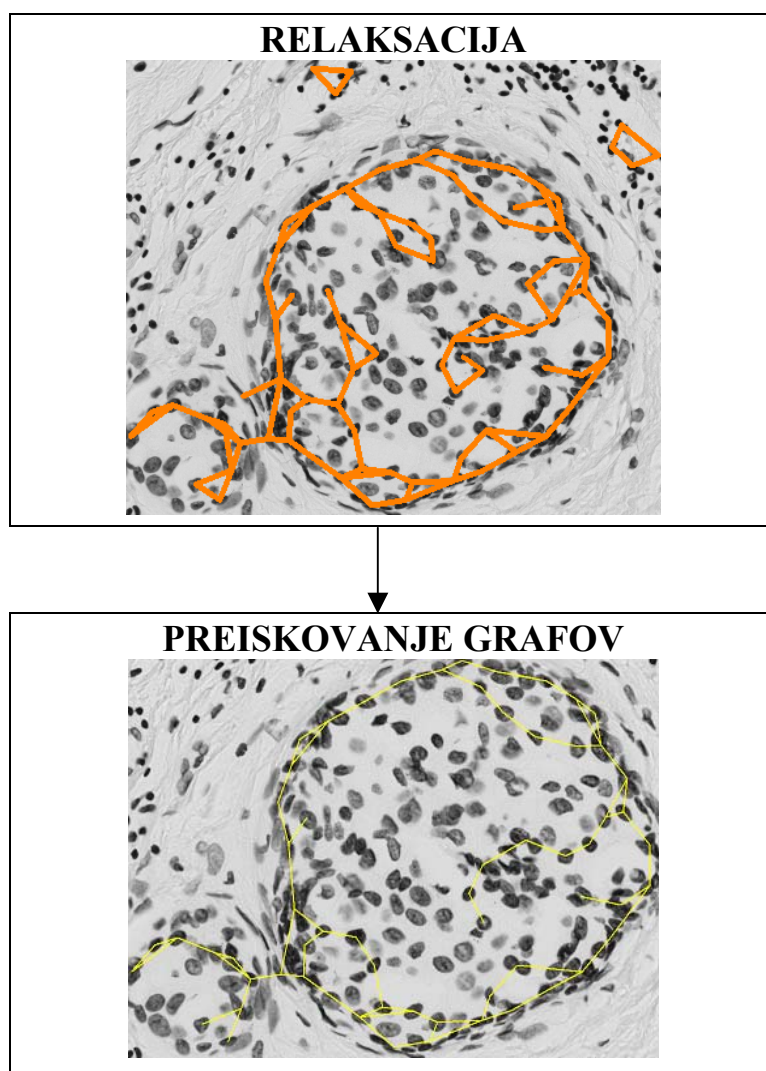


SEGMENTACIJA CELIČNIH JEDER



**OCENA POVEZAV IN IZBIRA
NAJBOLJŠIH**





Slika 4.1 Shema postopka odkrivanja robov skupkov celičnih jeder

5 SEGMENTACIJA NA PRINCIPU UPRAGOVANJA

5.1 UPRAGOVANJE

Najbolj enostaven proces segmentacije je upragovanje sivinske slike¹. Pri tem postopku binariziramo sliko na predmete in ozadje.

Funkcija upragovanja [17]:

$$\begin{aligned} g(i, j) &= 1 && \text{za } f(i, j) \geq T \\ &= 0 && \text{za } f(i, j) < T \end{aligned} \tag{3.3}$$

$f(i, j)$ je intenziteta barve slikovnega elementa (i, j) .

T je vrednost praga, meja med predmeti in ozadjem.

Tak način segmentacije je najbolj primeren za slike, kjer so meje med ozadjem in objekti jasno določene (primer je skenirano besedilo).

Uspešnost postopka pogojujejo:

- veliki kontrasti med objekti in ozadjem,
- homogeno ozadje,
- objekti se med seboj ne smejo stikati,
- pravilna izbira vrednosti praga.

5.2 IZBIRA PRAGA

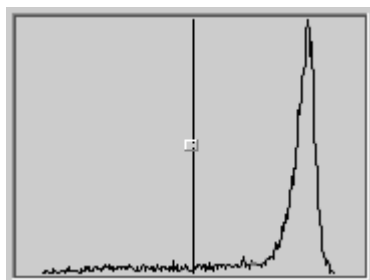
Pravilna izbira praga igra pomembno vlogo še posebej pri slikah, kjer so meje med objekti in ozadjem zabrisane in tam, kjer se objekti med seboj stikajo. Tu moramo poiskati

¹ To je način, ki smo ga uporabili pri našem poskusu.

kompromis med izbiro praga, ki odkrije vse objekte (tudi svetlejše), in pragom, ki odkrije meje med objekti – loči objekte, ki so si zelo blizu skupaj oz. se celo stikajo.

Prag lahko izberemo s pomočjo histograma svetlosti slike. Primer histograma celotne slike celičnih jeder tkiva dojke (slika 5.2) je prikazan na sliki 5.1. Na abscisni osi se nahaja intenziteta slike – možne vrednosti slikovnih elementov. Na ordinatni osi pa je število slikovnih elementov s posamezno vrednostjo.

Na histogramih naših slik je lepo vidno območje ozadja. Vendar pa optimalne meje med ozadjem in objekti ni mogoče razbrati.



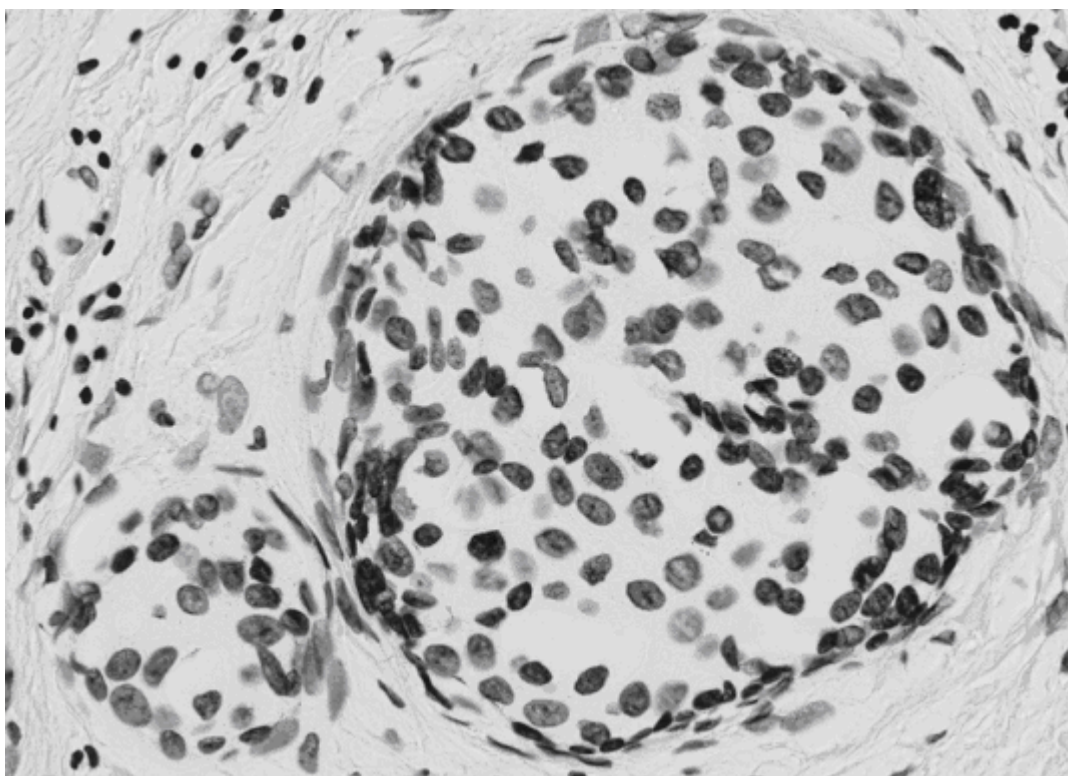
Slika 5.1 Primer histograma za sliko celičnih jeder

V našem primeru segmentacije celičnih jeder smo prag nastavili ročno. Pri tem smo poskušali čim bolj izolirati posamezna jedra in jih pri tem pogoju kar največ zaznati (detektirati). Vsaka slika je imela svoj prag. Optimalni pragovi slik so si med seboj zelo različni. Slikovni elementi imajo vrednost med 0 in 255. Vrednosti pragov pa so se gibale med 55 in 190. Pri avtomatskem določanju optimalnega praga bi si lahko pomagali s histogramom svetlosti, z analizo velikosti in analizo oblike jeder, vendar smo imeli na voljo le 13 slik. To pa je premajhen vzorec za statistično obdelavo. Poleg tega bi morali te slike razdeliti še na podskupine: normalni, maligni in potencialno maligni vodi. Tako bi imeli za vsako skupino le nekaj primerov.

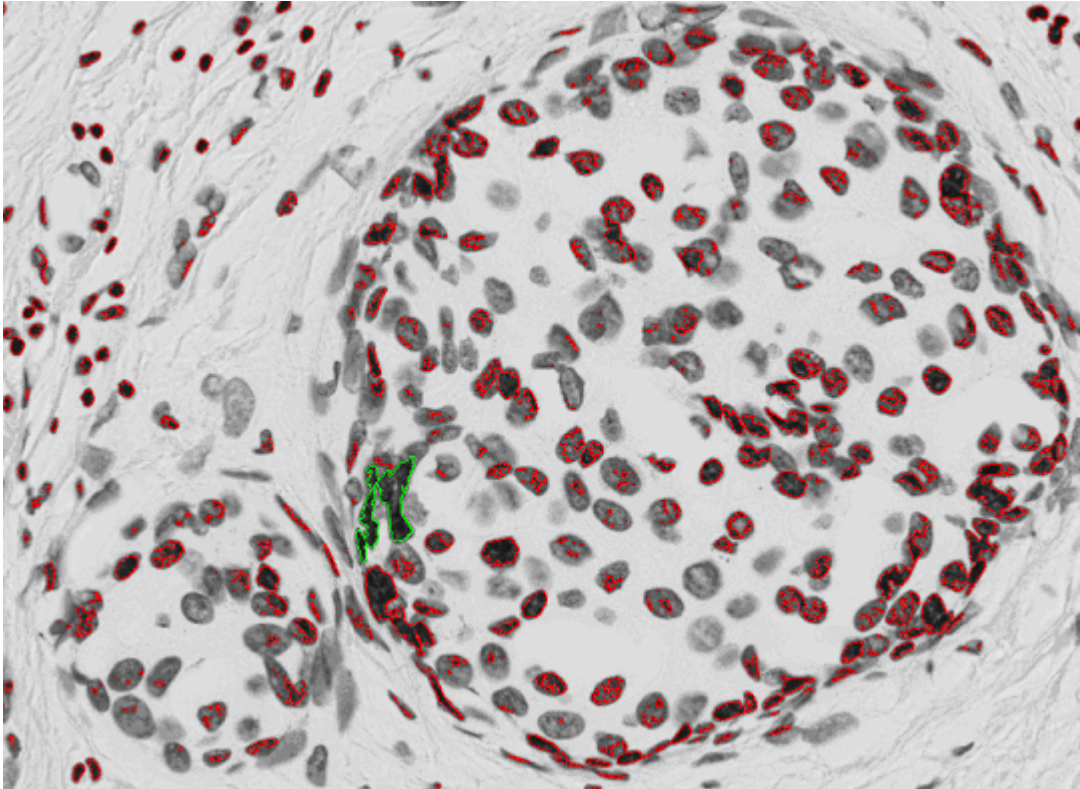
Na spodnjih slikah (slike 5.2 – 5.5) je prikazano upragovanje slike¹. Vse slike (tudi v naslednjih poglavjih), ki prikazujejo postopek odkrivanja robov, so izdelane avtomatsko s pomočjo programa, ki smo ga razvijali hkrati s postopkom za odkrivanje robov.

¹ Ker so slike prevelike, da bi jih prikazali v celoti, so v večini primerov prikazani le njihovi deli. Večina jih tudi ni v enakem merilu, ampak so pomanjšani toliko, da je slika še razumljiva.

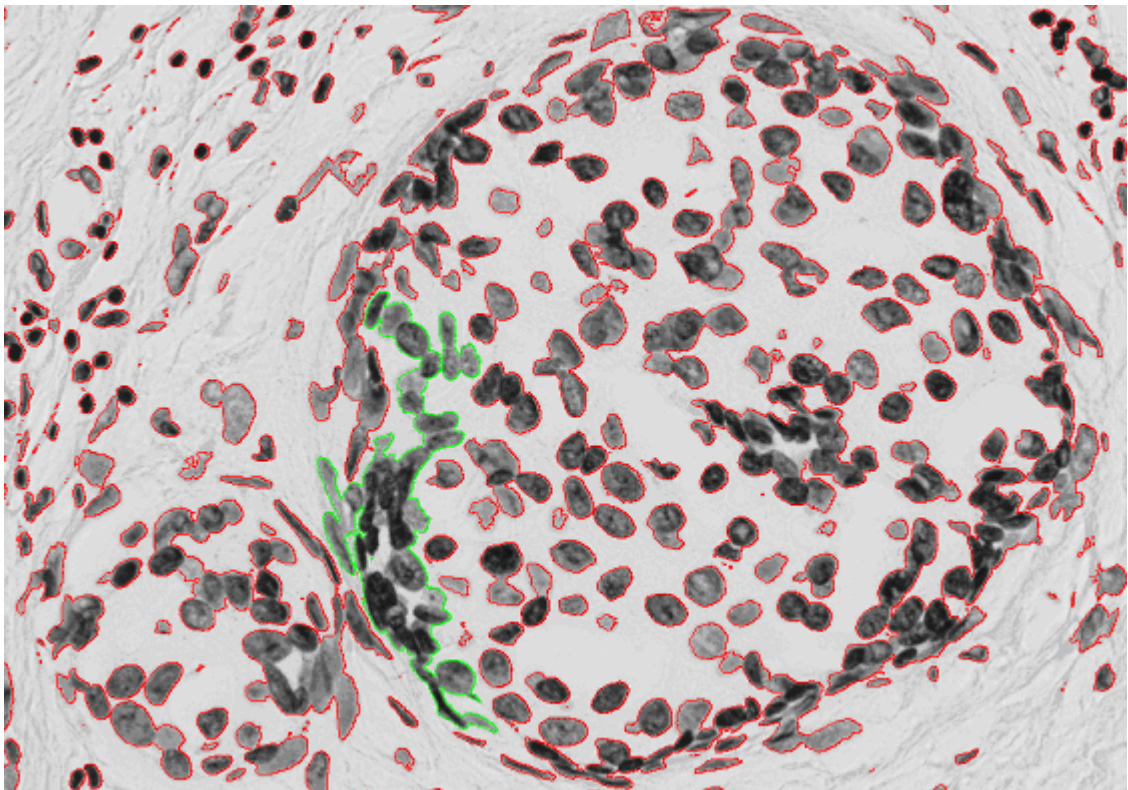
Segmentirani deli so obkroženi z rdečo barvo. Z zeleno barvo obkrožen del prikazuje primer napačne segmentacije, saj objekte, ki so skupaj, obravnava kot en sam objekt. S spreminjanjem praga se segmentacija spreminja, vendar napaka zaradi nejasne slike ostaja.



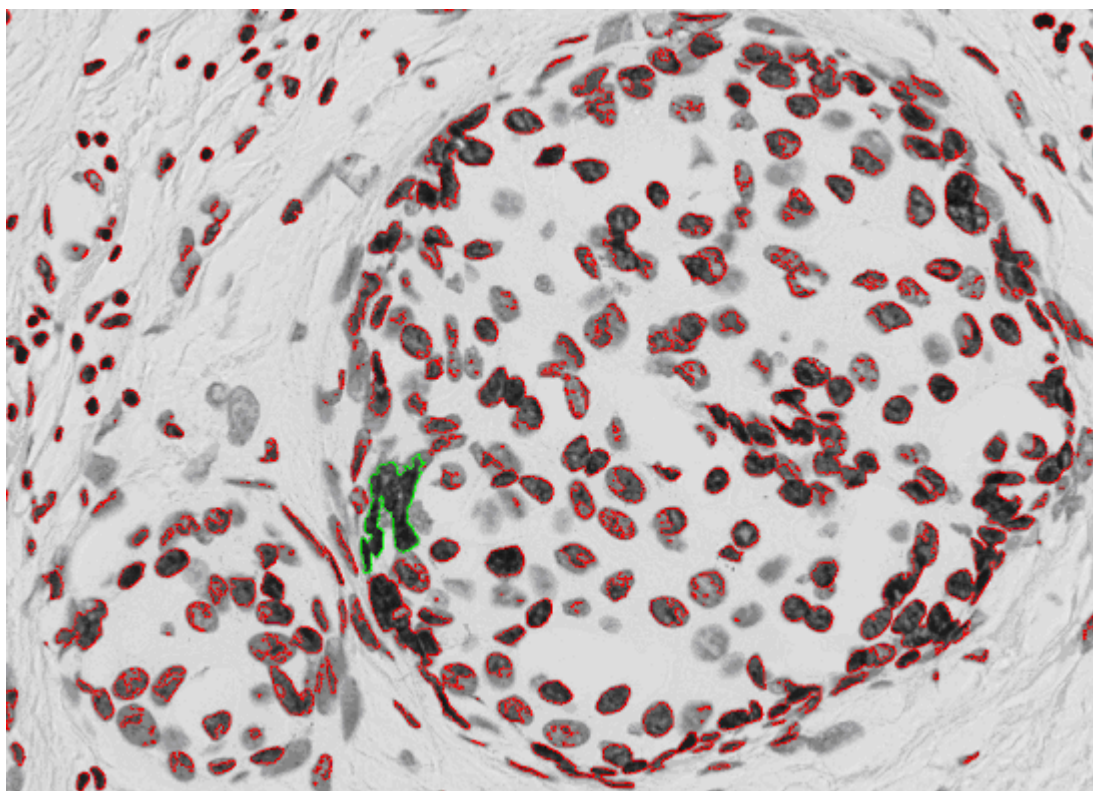
Slika 5.2 Slika celičnih jeder



Slika 5.3 Prenizek prag (prag = 63)



Slika 5.4 Previsok prag (prag = 178)

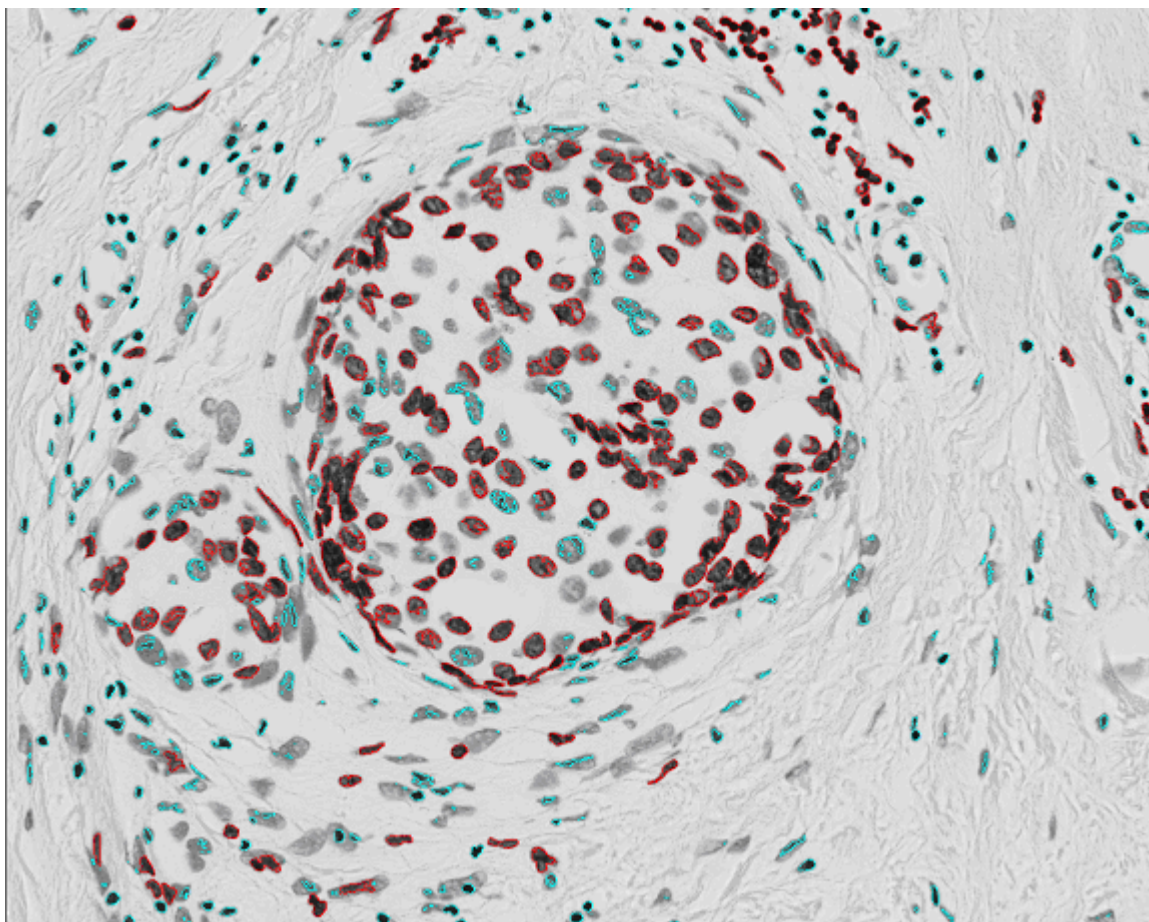


Slika 5.5 Približek idealnega praga (prag = 97)

5.3 IZBOLJŠANJE ENOSTAVNE SEGMENTACIJE Z UPRAGOVANJEM- ODPRAVLJANJE ŠUMA

a) Dodatni delci

Poleg rakavih žleznih jeter segmentacija odkrije tudi jedra limfocitov, ki tudi vsebujejo DNK in se obarvajo. Vsi ti delci predstavljajo šum in so škodljivi pri nadaljnji obdelavi slik. Prav tako so nezaželena jedra vezivnega tkiva, ki se pojavljajo v okolici žleze, so pa v primerjavi z rakavimi žleznimi jedri manjša. Precej tega »šuma« smo odpravili tako, da smo postavili še dodaten prag za velikost segmentiranih delov. Tako delce, ki so manjši od praga velikosti, enostavno eliminiramo.

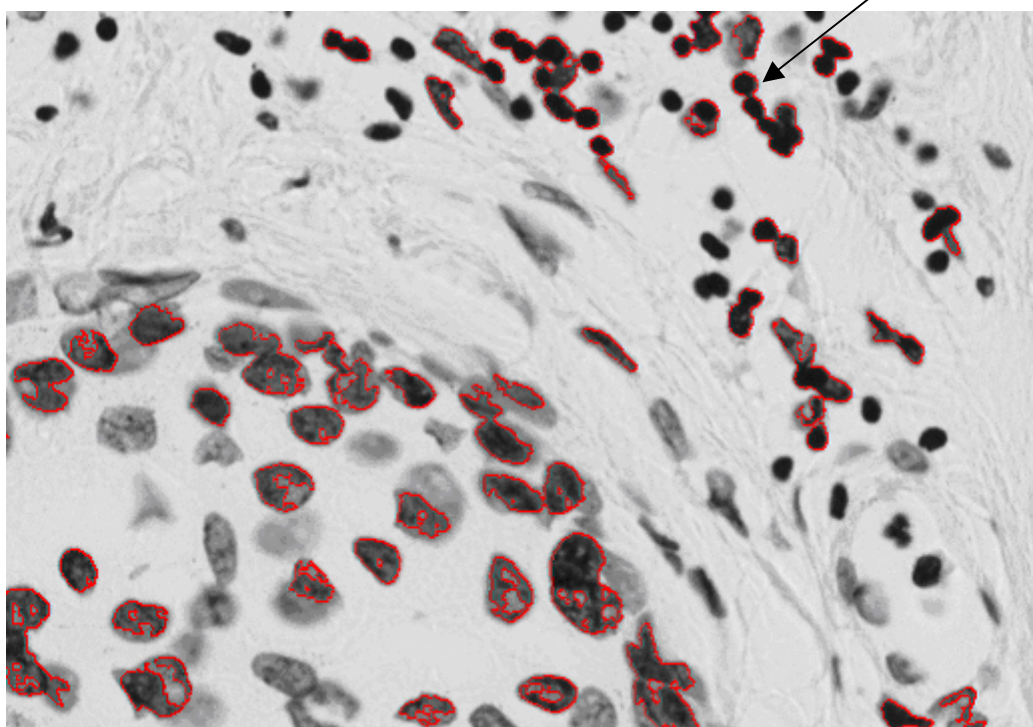


Slika 5.6 Majhne delce zavržemo (prag za velikost delcev = 200)

Na sliki 5.6 so delci, ki jih zavržemo, obkroženi s svetlo modro barvo.

Z dodatnim pragom velikosti ne odpravimo šuma v celoti, kajti tam, kjer se šumni delci stikajo, še vedno dobimo področja, ki so večja od meje praga velikosti. Tudi tu imamo problem stikanja posameznih elementov (slika 5.7).

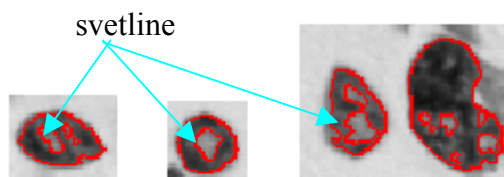
Objekti, ki predstavljajo šum. Ta šum se pojavi zato, ker so ti objekti zelo temni in skupaj. Tako jih ne eliminirata niti prag segmentacije niti prag za velikost jeder.



Slika 5.7 Gruče šuma

b) Odpravljanje svetlin

Ker jedra na sliki niso bila obarvana enakomerno, so se včasih v jedrih pojavljale svetline (slika 5.8), to je prostor v jedru, ki ga segmentacija dodeli ozadju. Te svetline so posledica razredčenih delov kromatina v jedru (lastnost jedra) ali pa nastanejo med postopkom priprave jeder za analizo (zunanji vpliv). Šum, ki ga povzročajo zunanji vplivi, imenujemo artefakti. Če se je znotraj segmentiranega objekta pojavila svetlina, ki je pripadala ozadju, smo jo enostavno spojili z jedrom (sliki 5.8 in 5.9).



Slika 5.8 Jedra s svetlinami

c

Slika 5.9 Ista jedra kot na sliki 5.8, le da smo svetline spojili z jedrom

V splošnem ta korekcija segmentacije ni bistveno vplivala na končne rezultate, ker so imele take zanke majhno površino. Vplivala je predvsem na določitev orientacije celičnega jedra.

5.4 DODATNI PREDLOGI ZA IZBOLJŠANJE SEGMENTACIJE

Skupke celičnih jeder, ki jih segmentacija obravnava kot en objekt, je potrebno ločiti na toliko objektov, kot jih skupek vsebuje. To lahko naredimo tako, da ponovno segmentiramo tisti del slike, kjer se ta skupek nahaja, z drugačnim pragom, kot smo ga uporabili za celotno sliko. V tem primeru torej ne bi imeli enega globalnega praga, ampak za posamezne dele slike lokalne pragove.

Lahko pa bi grobo segmentirane dele bolj natančno segmentirali še s Houghovim transformom, z metodo aktivnih kontur ali s kakšno drugo metodo.

6 IZBIRA IN OCENA NAJBOLJŠIH POVEZAV

Po opravljeni segmentaciji je potrebno posamezne objekte, celična jedra, med seboj povezati.¹ Pri tem uporabljamo različne kriterije povezljivosti in geometrijske lastnosti segmentiranih objektov. Kriteriji, opisani v poglavju 6.1 in 6.2, temeljijo na lokalnosti, saj povezujejo med seboj po dva sosednja objekta.

S pomočjo povezav med posameznimi jedri smo v kasnejših korakih lahko zgradili celoten rob skupka celičnih jeder. Korak izbire in ocene najboljših povezav je potreben zato, ker smo v končni fazi rob zgradili le iz najboljših povezav.

6.1 GEOMETRIJSKE LASTNOSTI

a) ploščina posameznega objekta (A)

$$A = \sum_x \sum_y b(x, y) \quad (4.1)$$

$b(x, y) = 1$, če slikovni element pripada objektu

$b(x, y) = 0$, sicer

b) lega težišča (\bar{x}, \bar{y})

$$\bar{x} = \frac{\sum_x \sum_y x b(x, y)}{\sum_x \sum_y b(x, y)} \quad (4.2)$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_x \sum_y y b(x, y)}{\sum_x \sum_y b(x, y)} \quad (4.3)$$

¹ V nadaljevanju imenujemo jedro vsak objekt, ki smo ga pridobili pri segmentaciji. Nadaljnje delo temelji na predpostavki, da je segmentacija točna. Tudi če je v nekem objektu zgnetenih več jeder, jih obravnavamo kot eno samo.

c) orientacija (θ)

(tu računamo druge momente)

$$a = \sum_x \sum_y (x - \bar{x})^2 b(x, y) \quad (4.4)$$

$$b = 2 \sum_x \sum_y (x - \bar{x})(y - \bar{y}) b(x, y) \quad (4.5)$$

$$c = \sum_x \sum_y (y - \bar{y})^2 b(x, y) \quad (4.6)$$

$$\tan 2\theta = \frac{b}{a - c}, \text{ razen za } b = 0, a = c \quad (4.7)$$

d) okroglost objekta (o)

$$\sin 2\theta = \pm \frac{b}{\sqrt{b^2 + (a - c)^2}} \quad (4.8)$$

$$\cos 2\theta = \pm \frac{a - c}{\sqrt{b^2 + (a - c)^2}} \quad (4.9)$$

Razmerje med najmanjšo in največjo vrednostjo E nam pove, kako okrogel je predmet. Če je $o=0$, imamo premico, za $o=1$ imamo krog.

$$o = \frac{\min(E)}{\max(E)} \quad (4.10)$$

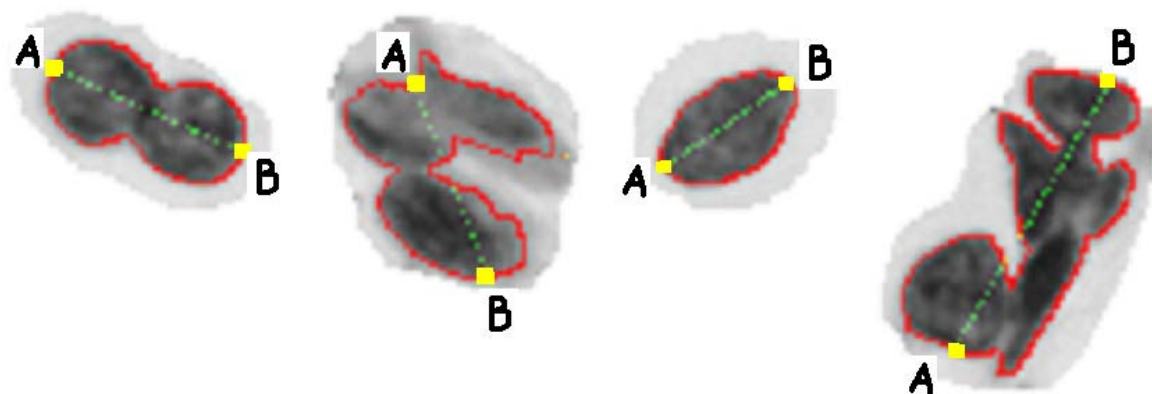
$$E = \frac{1}{2}(a + c) - \frac{1}{2}(a - c)\cos 2\theta - \frac{1}{2}b\sin 2\theta \quad (4.11)$$

$\min(E)$ dobimo, če v zgornjo enačbo vstavimo pozitivni rešitvi za $\sin 2\theta$ in $\cos 2\theta$
 $\max(E)$ dobimo, če v zgornjo enačbo vstavimo negativni rešitvi za $\sin 2\theta$ in $\cos 2\theta$

e) dolžina objekta (l)

Dolžino objekta računamo tako, da skozi težišče (\bar{x}, \bar{y}) pod kotom orientacije θ potegnemo premico. Najbolj oddaljeni točki (A in B) na premici, ki še pripadata objektu, predstavljata rob objekta (slika 6.1). Evklidska razdalja med tema točkama predstavlja dolžino objekta.

$$l = \sqrt{(x_a - x_b)^2 + (y_a - y_b)^2} \quad (4.12)$$



Slika 6.1 Dolžina jedra

f) objekt – daljica

Objekte smo v nadaljevanju večkrat obravnavali kot daljice, in sicer smo za daljice vzeli, kar tisto, ki je predstavljal dolžino objekta.

6.2 KRITERIJI POVEZLJIVOSTI

Možni kriteriji, ki vplivajo na to, ali sta dva segmentirana objekta med seboj povezana, so lahko bližina, paralelizem, vzporednost [17], kriterij kotov itd. Možne so različne formulacije naštetih kriterijev. V nadaljevanju je opisanih nekaj predlogov.

a) bližina (μ_{pro})

upoštevamo velikost objekta: $\mu_{pro} = \left(\frac{l_s}{g}\right)^2 \quad (4.13)$

ne upoštevamo velikosti objekta: $\mu_{pro} = \left(\frac{1}{g}\right)^2$ ali $\mu_{pro} = \left(\frac{1}{g}\right) \quad (4.14)$

g – najmanjša razdalja med koncema dveh slikovnih elementov

l_s – dolžina krajšega segmenta

b) paralelizem (μ_{par})

upoštevamo velikost objekta: $\mu_{par} = \frac{l_s^2}{\Theta s l_l}$ (4.15)

ne upoštevamo velikosti objekta: $\mu_{par} = \frac{1}{\Theta s}$ (4.16)

l_l – dolžina daljšega segmenta

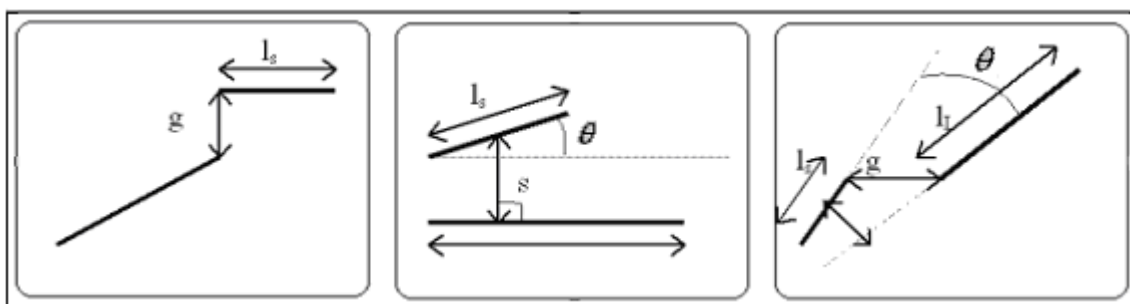
Θ – kot med dvema segmentoma

s – oddaljenost dveh segmentov, definirana kot razdalja med sredino krajšega segmenta in daljšim segmentom

c) vzporednost (μ_{col})

upoštevamo velikost objekta: $\mu_{col} = \frac{l_s^2}{\Theta s (l_s + g)}$ (4.17)

ne upoštevamo velikosti objekta: $\mu_{col} = \frac{1}{\Theta s g}$ (4.18)



Slika 6.2 Grupiranje: (a) bližina, (b) paralelnost, (c) kolinearnost [17]

d) kriterij kotov (μ_{ang})

$$\mu_{ang} = \Sigma - \Theta \quad (4.19)$$

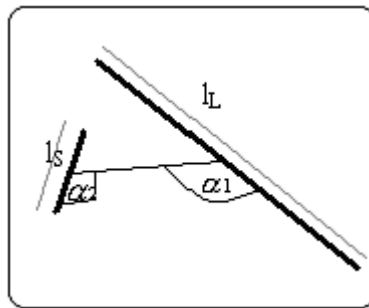
$$\Sigma = l_1 * \alpha_1 + l_2 * \alpha_2 \quad (4.20)$$

$$l_1 = \frac{l_s}{l_s + l_L} \quad (4.21)$$

$$l_2 = 1 - l_1 \quad (4.22)$$

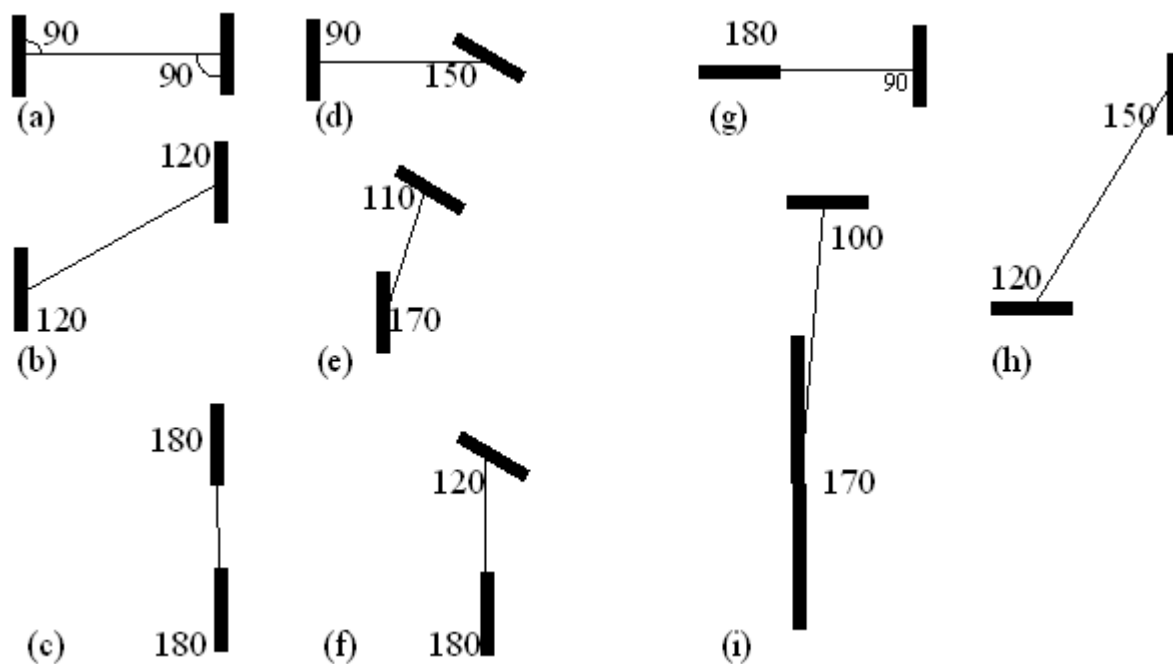
Θ – kot med dvema segmentoma

Σ – vsota največjih kotov, ki jih oklepata segment in povezava (slika 6.3), obtežena z dolžino posameznega segmenta.



Slika 6.3 Kriterij kotov

To je kriterij, ki smo ga v nadaljevanju največ uporabljali, saj zadostuje večini pogojev, ki jih zahtevamo pri povezavi jeder med seboj.



Slika 6.4 Primeri ocenjenih povezav s kriterijem kotov

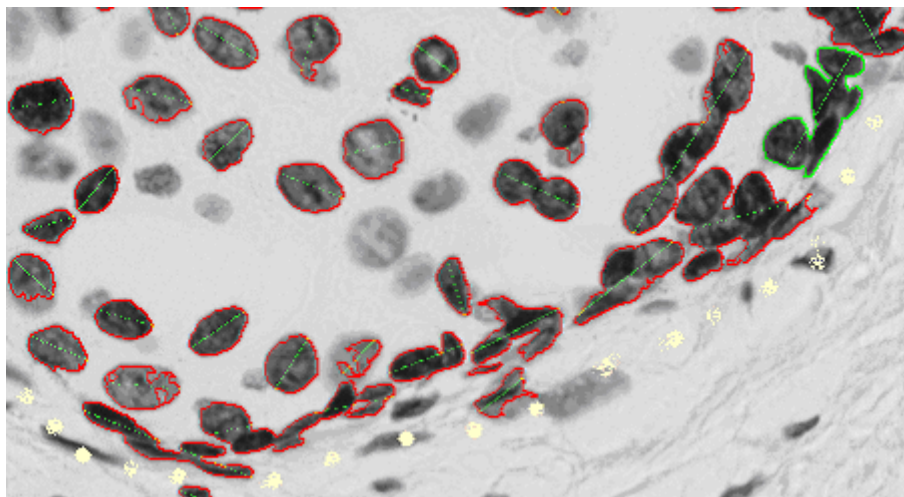
Na sliki 6.4 je prikazano nekaj primerov kriterija funkcij. Razen v primeru i sta dolžini obeh objektov enaki.

Izračunana vrednost za primere od a do i:

	$\Sigma = l_1\alpha_1 + l_2\alpha_2$	Δ	$\Sigma - \Delta$
a	90	0	90
b	120	0	120
c	180	0	180
d	120	60	60
e	140	60	80
f	150	60	90
g	135	90	45
h	135	90	45
i	$0,8 \cdot 170 + 0,2 \cdot 100 = 156$	90	66

Kriterij bolje oceni tiste povezave (pri enakem kotu), ki so bolj kolinearne kot tiste, ki so bolj vzporedne. Vrednost (primer i) je velika, če upoštevamo, da sta si objekta pravokotna. Ker pa sta povezana v smeri večjega (»bolj pomembnega«) objekta, se vrednost poveča. To je v konkretnem primeru celičnih jeder ugodno zato, ker se večkrat zgodi, da so skupaj

segmentirana ravno jedra po robu, ki ga želimo detektirati. Jedra ob robu so bolj sploščena in obrnjena tangentno na rob (slika 6.5). (Sploščena jedra na robu voda pripadajo vezivnemu in ne žleznemu tkivu.) Skupaj tvorijo večji objekt v smeri roba. Na ta način damo večjo težo tistim povezavam, ki so v smeri roba, in manjšo tistim, ki iz te smeri odstopajo.



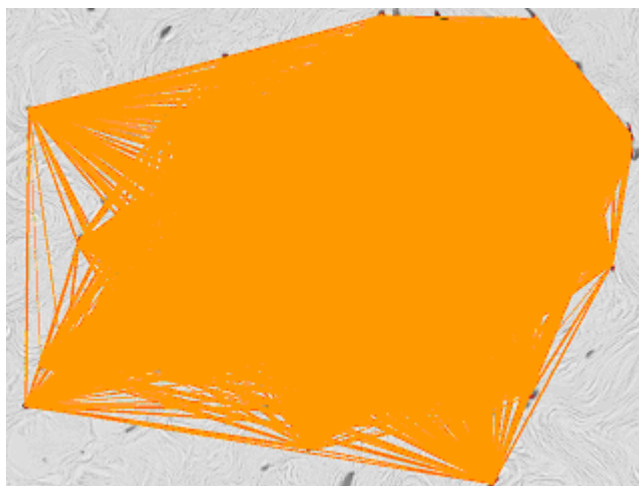
Slika 6.5 Rob (smer je označena z rumeno barvo)

V konkretnem primeru povezovanja celičnih jeder smo uporabili kriterija bližine in kriterij kotov. Pri različnih kombinacijah zgoraj opisanih kriterijih sta se ta dva v našem primeru izkazala kot najbolj optimalna.

6.3 POSTOPEK IZBIRANJA NAJUSTREZNEJŠIH POVEZAV

Na začetku lahko predpostavimo, da je vsako jedro povezano z vsakim. Če bi v nadaljevanju obravnavali, da je vsako jedro povezano z vsakim, bi imeli opravka s slikami, kot je prikazano na sliki 6.6.

Ker je nad tako množico povezav praktično nemogoče izvajati relaksacijo (iterativni postopek ocenjevanja povezav), je potrebno omejiti število povezav. V postopku izbiranja povezav se omejimo tako, da ima na koncu - pred vhomom v relaksacijo - vsako jedro največ štiri povezave.

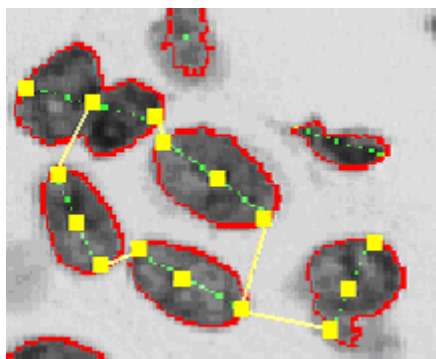


Slika 6.6 Povezave 'vsak z vsakim'

Postopek izbiranja najboljših povezav poteka v treh korakih. Povezave postopoma odvezujemo s slike. Ne moremo jih odstraniti v enem koraku, ker nekateri kriteriji (obodna povezava, mejna povezava – opisani so v nadaljevanju) ohranjanja in odstranjevanja povezav ne delujejo učinkovito na množici povezav »vsak z vsakim« (slika 6.6). Kriteriji, ki jih uporabljamo v prvih korakih, pa niso zadostni, da bi odvezeli dovolj odvečnih povezav. Če kriterijem iz prvih korakov dovolimo, da odvezamejo veliko povezav, začnejo brisati tudi povezave, ki so za nadaljnje odkrivanje robov ključne. Kot najbolj optimalna metoda odvezovanja in ohranjanja povezav se je izkazala metoda, ki poteka v več korakih in je opisana v poglavjih od 6.3.1 do 6.3.3.

6.3.1 KORAK 1 – OHRANIMO NAJBЛИŽJE POVEZAVE

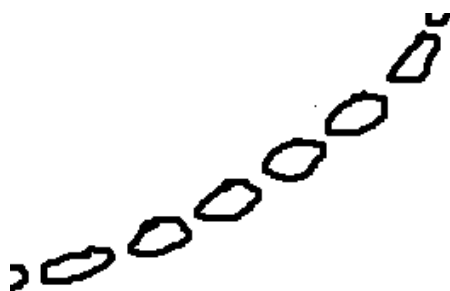
Najprej omejimo povezave z razdaljo med posameznimi jedri. Pri računanju razdalje se omejimo na karakteristične točke posameznega jedra. To so masno središče ter robni točki diagonale. Izračunamo evklidske razdalje za vseh 9 parov točk. Če računamo razdaljo med jedroma A in B, eno točko v paru predstavlja ena izmed karakterističnih točk jedra A, drugo karakteristična točka jedra B.



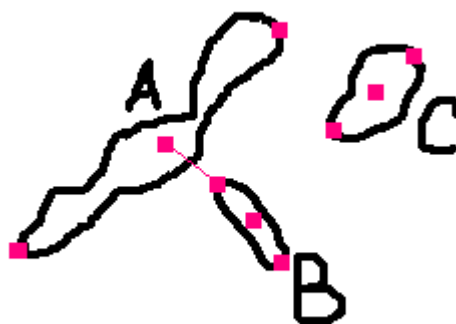
Slika 6.7 Karakteristične točke in nekatere razdalje med jedri

Slika 6.7 prikazuje karakteristične točke, ki so označene z rumenimi kvadrati, in razdalje med njimi, ki smo jih označili z rumenimi črtami.

Intuitivno bi bilo vzeti samo robne točke diagonale. Vendar jedra včasih niso tangentna na rob, ki ga poskušamo detektirati. Jedra, ki so razporejena po robu, niso vedno tako idealno postavljena kot prikazuje slika 6.8 Pri izbiri najboljših povezav je tako varneje, da upoštevamo tudi masna središča in s tem ne izločamo morda ključnih povezav. Slika 6.9 prikazuje primer razdalje med objektoma A in B. V tem primeru bi bila razdalja med njima precej večja, če bi upoštevali le robne točke in ne tudi masnih središč. Taki primeri se večkrat pojavljajo ravno na robu. Če ne bi upoštevali tudi masnega središča, bi bilo jedro B bližje objektu C, kar pa ni res.

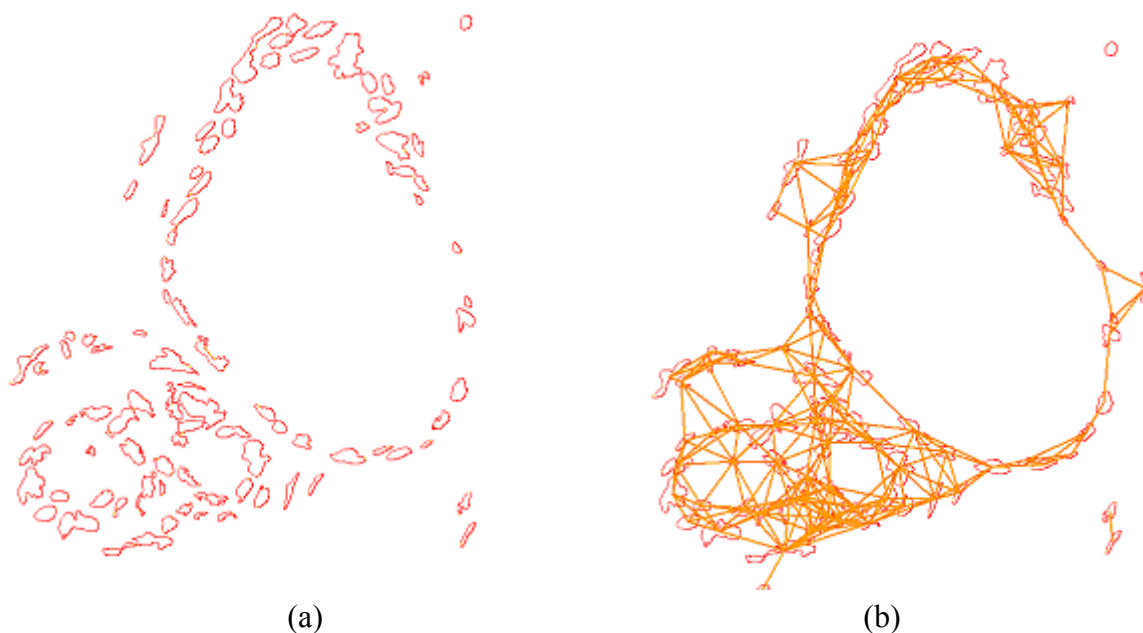


Slika 6.8 Shema roba skupka celičnih jeder

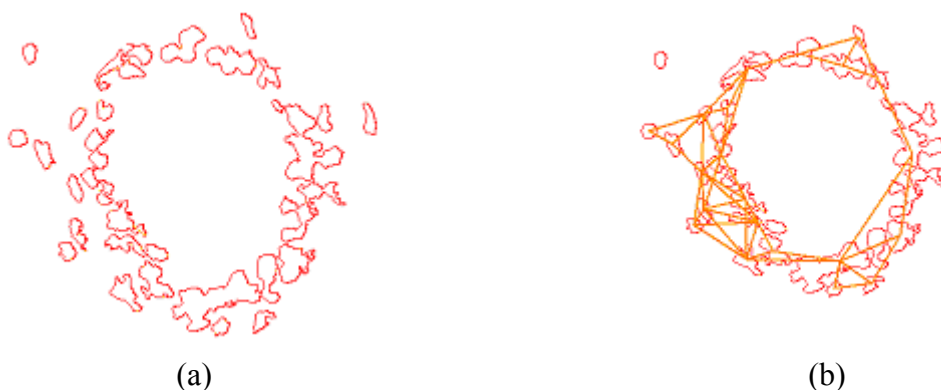


Slika 6.9 Razdalja med objekti

Po tem koraku se množica potencialnih povezav precej zmanjša, saj vzamemo le povezave, ki so krajše od nekega praga. Ta prag je specifičen za vsako sliko. V našem postopku smo ga nastavljali ročno. Za izboljšavo postopka bi bilo treba ta prag nastaviti avtomatsko. Ključni parameter pri iskanju optimalnega praga bi bil gotovo način porazdelitve jeder. Če so jedra bolj gosto posejana, je ta prag manjši in obratno, bolj oddaljena so med seboj jedra, večji je ta prag. Optimalni prag pa je odvisen tudi od segmentacije. Če je prag osvetlitve večji (kot objekte vzamemo tudi svetlejša slikovna elementa), je razdalja med segmentiranimi deli manjša in obratno, manjši je prag osvetlitve, večja je razdalja med posameznimi objekti.



Slika 6.10 Izbira najkrajših povezav (prag=55): (a) samo segmentirani delci, (b) povezave med delci



Slika 6.11 Izbira najkrajših povezav ($\text{prag}=44$): (a) samo segmentirani delci, (b) povezave med delci.

Na slikah 6.10 in 6.11 vidimo, da je bilo potrebno pri sliki 6.10 izbrati večji prag za dovoljeno razdaljo med posameznimi objekti. Na sliki 6.10 so nekateri segmenti roba precej oddaljeni drug od drugega in če hočemo detektirati tudi ta del roba, moramo dvigniti dopustno razdaljo med posameznimi objekti na sliki. Na sliki 6.11 so si vsi segmenti roba precej blizu, zato je lahko prag razdalje manjši.

Povezave, ki jih v nekem koraku ne izberemo, so za vedno izgubljene. Zato mora biti postopek izbiranja zelo dobro definiran.

Napake, ki nastanejo, če postopek vseeno izbriše »dobro« povezavo, bi lahko rešili tako, da bi »boljše« izmed povezav, ki jih sedaj zavržemo, hranili v posebni množici potencialno dobrih povezav. Povezave iz te množice bi lahko v postopku odkrivanja robov pod posebnimi pogoji vračali med veljavne povezave.

Izbrane povezave iz prvega koraka so vhod v naslednji korak.

6.3.2 KORAK 2 – OHRANIMO NAJBOLJŠIH ŠEST

V naslednjem koraku se omejimo na največ 6 povezav za vsako jedro. Po kriteriju kotov ocenimo povezave, uredimo po padajočem vrstnem redu in jih po principu požrešnega algoritma dodajamo v novo množico potencialnih povezav toliko časa, dokler ni več možno

dodati nobene povezave ne da bi imelo kakšno jedro več kot 6 povezav. Slika 6.12 prikazuje situacijo po koraku »ohranimo najboljših šest.



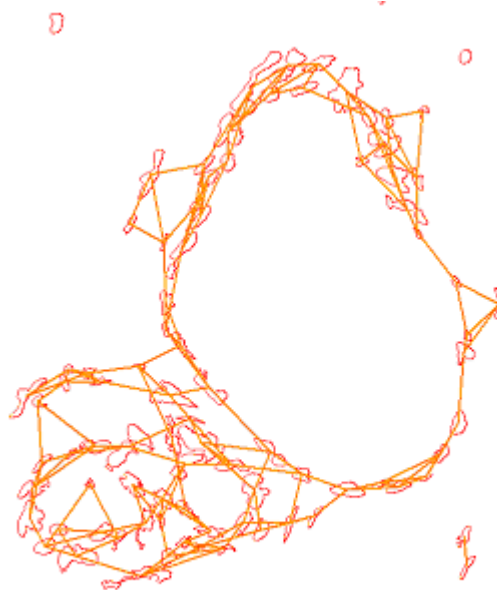
Slika 6.12 Izberi 6 najboljših sliki 6.10 b smo odstranili povezave. Razlika je predvsem tam, kjer so jedra gosto posejana.

6.3.3 KORAK 3 – OHRANIMO NAJBOLJŠE ŠTIRI

Tu število povezav iz drugega koraka še zmanjšamo. Povezave ponovno ocenimo. Sprehodimo se preko vseh jeder. Cenitvena funkcija najprej poišče (za vsako jedro posebej) povezavi, ki tvorita med seboj največji kot in med njima ni nobene druge povezave iz tega jedra. Ti dve povezavi ocenimo z oceno 6. Ostale (če so) pa ocenimo z ocenami od 4 navzdol, in sicer glede na kriterij kotov. Povezava z večjo vrednostjo kriterija kotov ima večjo ceno. Če se zgodi, da ima jedro eno samo povezavo, jo ocenimo z oceno 4. Ker vsaka povezava povezuje natančno dve jedri, dobi tudi dve oceni, od vsakega jedra po eno. Nova cenitvena funkcija je vsota teh dveh cen. Povezave ponovno uredimo po padajočem vrstnem redu, glede na novo oceno. Podobno kot v prejšnjem koraku tudi tu izbiramo povezave po metodi požrešnega programiranja, le da v tem koraku izberemo največ štiri povezave za

vsako jadro. Povezave, ki smo jih izbrali v tretjem koraku, tvorijo graf, ki je vhodni parameter za postopek relaksacije.

Povezave z največjim kotom smo izbrali zato, ker so to v veliki večini ravno povezave, ki tvorijo rob, ki ga poskušamo detektirati. Slika 6.13 prikazuje situacijo po koraku »ohranimo najboljše štiri«.



Slika 6.13 Nad sliko 6.12 smo izvedli še korak: izberi 4 najboljše

7 RELAKSACIJA

Povezave, ki smo jih izluščili s postopkom »izberi štiri najboljše«, so vsi možni kandidati za opis zunanjih in notranjih robov skupkov, ki jih tvorijo celična jedra.

Relaksacija povezav je način postopnega spreminjanje vrednosti povezav. Ko vrednost povezave naraste nad neko vrednost, povezava postane del roba. Povezavam se lahko vrednost manjša ali večja, odvisno od lastnosti povezave in pravil, ki določajo novo vrednost povezave. Postopek je iterativen in ga lahko ponavljamo toliko časa, dokler se vrednost nobeni povezavi več ne spremeni oz. dokler vse povezave ne dosežejo nekega maksimuma (jih torej označimo kot del roba) ali minimuma (niso del roba). Lahko pa tudi sami določimo optimalno število iteracij, ker se pri takem postopku večkrat lahko zgodi, da preveliko število ponavljanj poslabša rešitev [16].

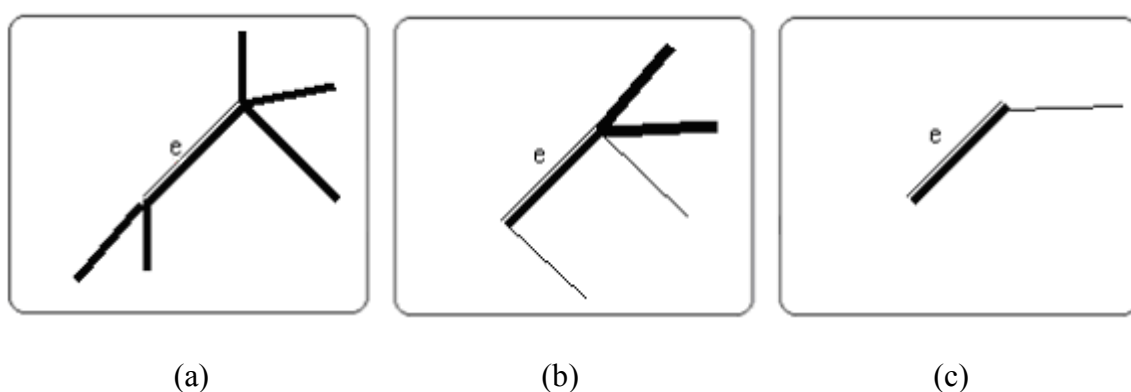
Pri postopku izbiranja najboljših povezav so bile povezave ocenjene čisto lokalno. Tudi pri postopku relaksacije pravila, po katerih spreminjamo vrednost posamezne povezave, še vedno temeljijo na lokalnosti. Na oceno namreč vplivajo le sosedje posamezne povezave in njena ožje okolica. Vendar z iteriranjem sosedje vplivajo na sosede in ti spet na svoje sosede itd. Tako se vpliv neke povezave širi iz ožje okolice na širše področje.

7.1 POSTOPEK RELAKSACIJE

1. Izračunamo začetno vrednost vsake povezave: $c_i^{(1)}$.
2. Določimo osnovne značilnosti povezave, kot je tip povezave, ali je povezava robna, itd.
3. Popravimo vrednost povezave $c_i^{(k+1)}$ glede na njene lastnosti in lastnosti bližje okolice in vrednost v predhodnem koraku iteracije: $c_i^{(k)}$.
4. Ponavljamo koraka 2 in 3, dokler se vrednosti povezav več ne spreminjajo oz. dokler se iteracija ne izvede tolikokrat, kot smo to določili na začetku.

7.1.1 DOLOČITEV TIPA POVEZAVE

Tip povezave je par dveh tipov vozlišč. Za vsak konec povezave imamo en tip. Tip vozlišča pa je število povezav, ki izhajajo iz vozlišča. Pri tem povezave, za katero določamo tip vozlišča, ne štejemo zraven. Tip povezave nam torej pove, koliko povezav nadaljuje posamezno vozlišče povezave, pri čemer sama povezava ni všteta zraven. Ker ima v našem primeru vsako vozlišče (jedro) največ 4 povezave, zavzemajo vrednosti od 0 do 3. Povezavo, ki nadaljuje neko vozlišče in je šibka glede na ostale povezave, pri določitvi tipa povezave ne upoštevamo. Primeri različnih tipov povezav se nahajajo na slikah 7.1a, 7.1b in 7.1c.



Slika 7.1 Tip povezav je (a) 2-3, (b) 1-2, (c) 0-1

Na sliki 7.1 prikazana povezava *e* pod (b) je *e* tipa 1-2, ker je vrednost ene izmed povezav glede na drugi dve (na istem vozlišču) precej manjša. Vrednost povezav je sorazmerna debelini narisanih povezav.

Tip vozlišča izračunamo po formuli [16]:

$$type(i) = \max_k (type(k)) \quad k = 0,1,2,3 \quad (5.1)$$

$$type(0) = (m-a)(m-b)(m-c)$$

$$type(1) = a(m-b)(m-c)$$

$$type(2) = ab(m-c)$$

$$type(3) = abc$$

a, *b*, *c* so vrednosti, ki pripadajo povezavam na istem vozlišču. Urejene so po padajoči vrednosti od *a* (največja) do *c* (najmanjša). Če vozlišče nadaljujejo manj kot 3 povezave, imajo manjkajoče povezave vrednost 0.

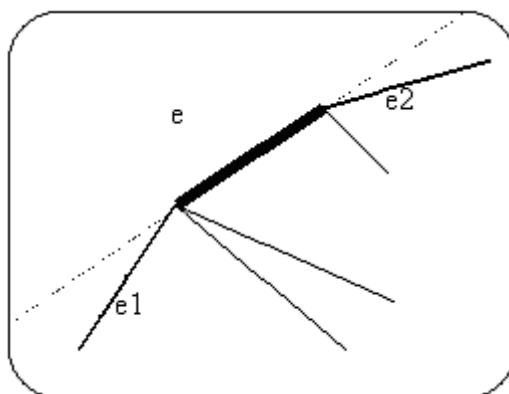
$$m = \max(a, b, c, q)$$

q – zagotavlja, da je $\text{type}(0)$ različen od nič tudi pri majhnih vrednostih a

Vrednosti povezav so v našem primeru lahko zavzemale vrednosti intervala: $[0, 100]$. q je imel vrednost 10.

7.1.2 OBODNOST POVEZAVE IN SOSEDI OBODNE POVEZAVE

Če ima povezava vse svoje sosednje povezave na svoji levi oz. na svoji desni (glede na premico, ki jo potegnemo skozi povezavo), potem je ta povezava obodna. Primer obodne povezave je prikazan na sliki 7.2.

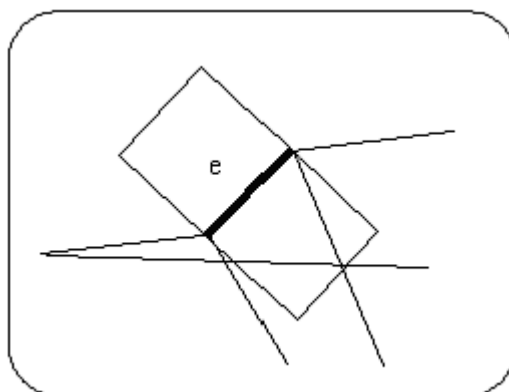


Slika 7.2 Obodna povezava

Povezava e je obodna, saj so vse njene sosede na isti strani (glede na črtkano črto). Povezavi (na vsaki strani ena), ki z njo oklepata največji kot, pa imenujemo sosedi obodne povezave.

7.1.3 MEJNOST POVEZAVE

Vsaki povezavi na levo in na desno narišemo kvadrat. Velikost stranice kvadrata je enaka dolžini povezave. Povezavo imenujemo mejna povezava, če je vsaj en kvadrat prazen. To pomeni, da ga ne prečka nobena povezava, da ne vsebuje nobene povezave. Mejnost povezave je prikazana na sliki 7.3.



Slika 7.3 Mejna povezava

Povezava e je mejna, saj ima zgornji kvadrat prazen. Spodnji kvadrat ni prazen, saj ga sekata kar dve povezavi.

7.1.4 POVEZAVA Z DVEMA MOČNIMA SOSEDOMA

Povezava spada med povezave z dvema močnima sosedoma, če ima na vsaki strani vsaj enega soseda, čigar vrednost je zelo visoka (v našem primeru je morala na skali od 0 do 100 presegati 98) in z njim oklepa precej velik kot (v našem primeru je morala s tako sosednjo povezavo oklepati kot, večji od 110°).

7.1.5 PRAVILA RELAKSACIJE

Začetno vrednost povezav smo izračunali po kriteriju kotov.

Spremembo vrednosti povezav pa računamo po funkcijah:

$$\text{če se vrednost povezave poveča za } \delta: \quad c^{(k+1)}(e) = \min(100, c^{(k)} + \delta) \quad , \quad (5.2)$$

$$\text{če se vrednost povezave zmanjša za } \delta: \quad c^{(k+1)}(e) = \max(0, c^{(k)} - \delta) \quad . \quad (5.3)$$

Za različne kriterije smo uporabili različne vrednosti δ :

$$\delta_0 = 0,5$$

$$\delta_1 = 1$$

$$\delta_2=3$$

$$\delta_3=5$$

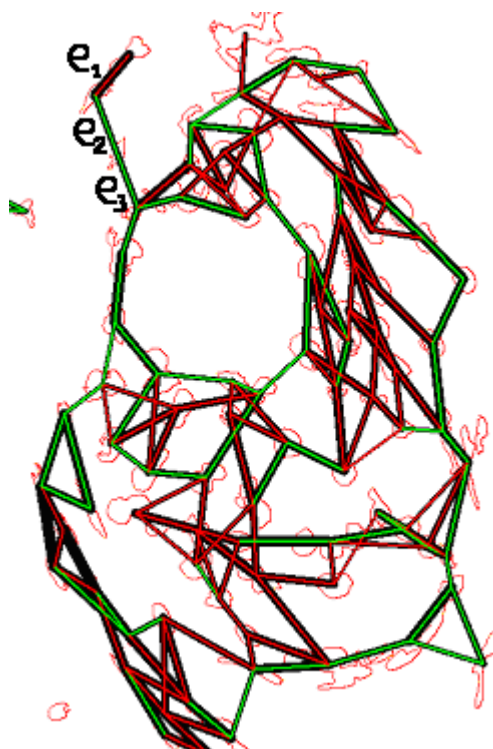
- Če je povezava obodna, vrednost povezave povečamo (δ_2), malo pa povečamo tudi njeni obodni sosedi (δ_1).
- Če je povezava mejna in ni tipa 0-0 ali tipa 0-x, njeno vrednost malo povečamo (δ_1).
- Če ima povezava dva močna soseda, njeno vrednost malo povečamo (δ_1).
- Če je povezava tipa 0 – 0, njeno vrednost močno zmanjšamo (δ_3).
- Če je povezava tipa 0 – x, njeno vrednost zmanjšamo (δ_2).
- Če povezava ni nič od zgoraj naštetega, jo minimalno zmanjšamo (δ_0).

Pri izboru pravil je potrebno precej pazljivosti, saj se včasih zgodi, da z nekim pravilom sicer izboljšamo stanje na eni sliki in ga hkrati poslabšamo na drugi. To predvsem velja za slike, ki se med seboj precej razlikujejo. Posebno pozornost je potrebno nameniti tudi vrednosti, za katero se vrednost povezave poveča ali zmanjša.

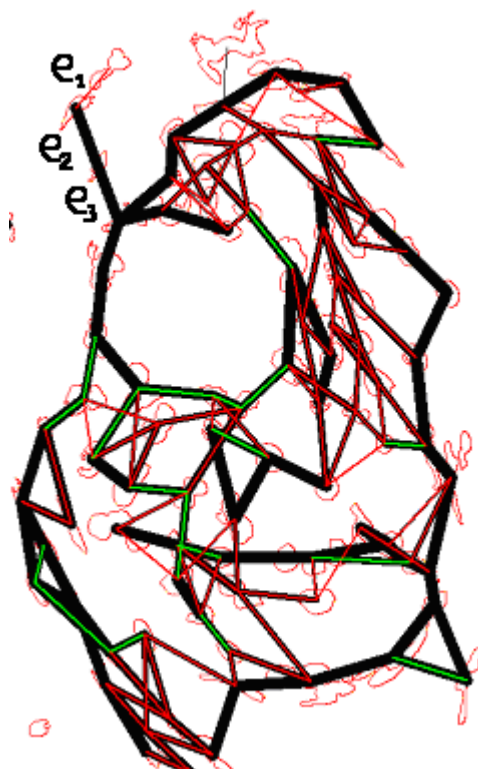
V primeru na spodnjih slikah od 7.4 do 7.8, je bilo potrebno paziti, da se je odvečen »rep« v postopku relaksacije resnično zmanjšal. Povezava e1 je bila tipa 0-1, torej se je njena vrednost zmanjševala. Hkrati pa je bila tudi sosednja obodni povezavi e2, torej se je njena vrednost povečevala. Pravila povečevanja in zmanjševanja vrednosti povezav je bilo v tem primeru potrebno uglasiti tako, da se je vrednost povezave e1 zmanjševala. Ko se je njena vrednost zmanjšala na 0, se je postopoma začela zmanjševati tudi vrednost povezave e2. Na tak način smo se znebili cele odvečne veje e1-e3. Primer je prikazan v poglavju 5.1.6.

7.1.6 PRIMER RELAKSACIJE

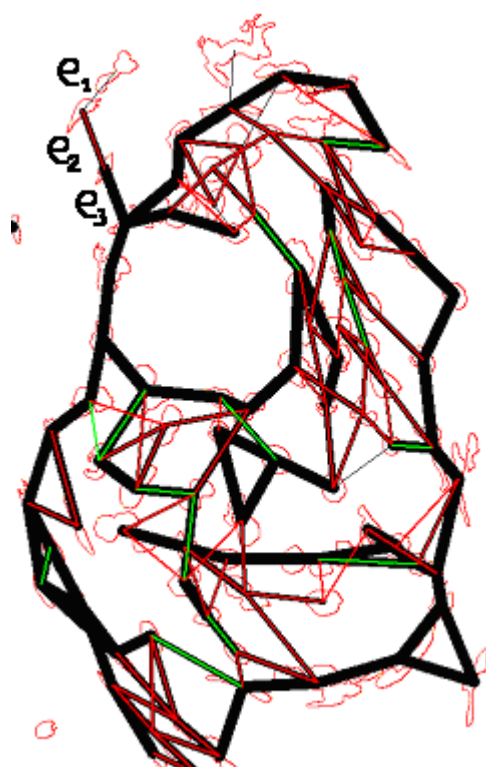
Rdečim povezavam na slikah vrednost zmanjšujemo, zelenim povečujemo, črne pa ostajajo po vrednosti enake. Debelina povezave pa nakazuje njeno vrednost.



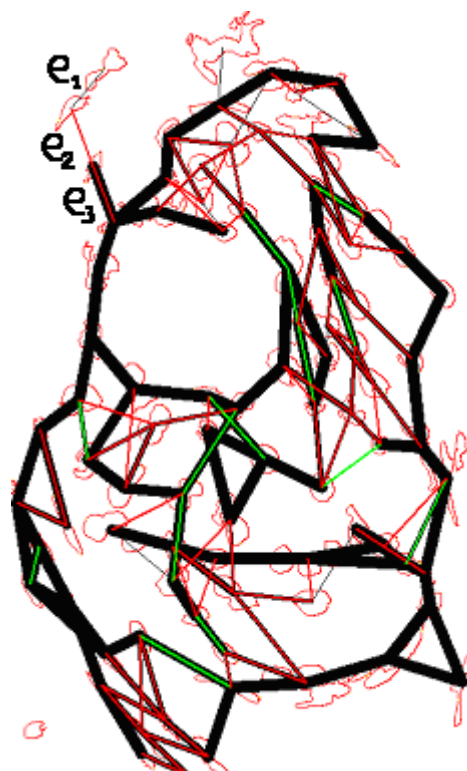
Slika 7.4 Slika po 5 iteracijah



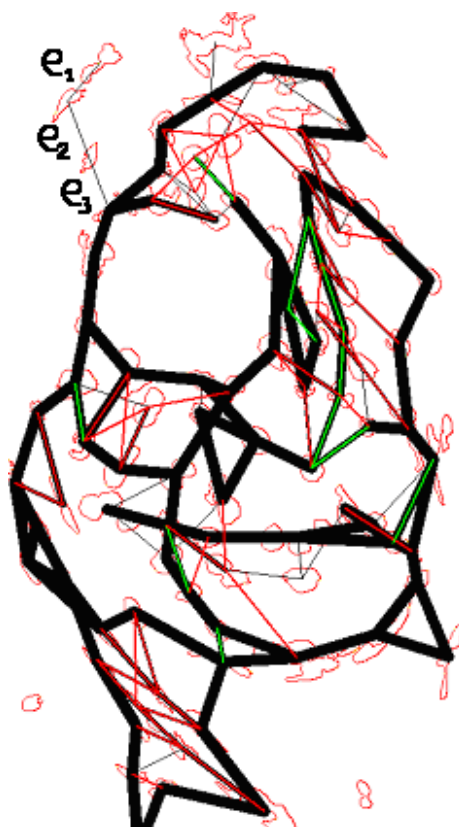
Slika 7.5 Slika po 20 iteracijah



Slika 7.6 Slika po 30 iteracijah.

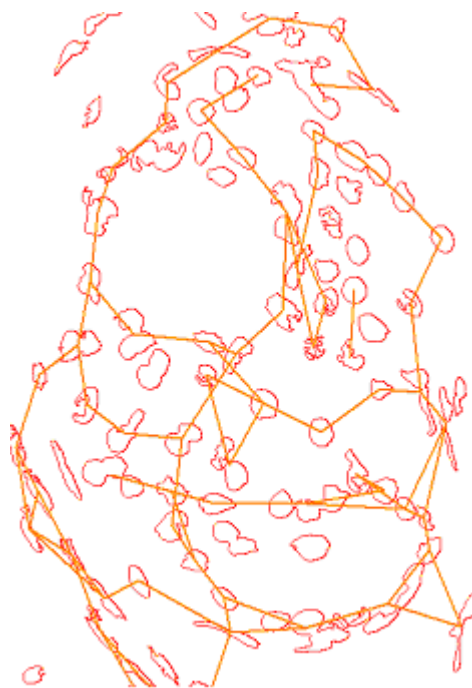


Slika 7.7 Slika po 40 iteracijah



Slika 7.8 Slika po 60 iteracijah

Na sliki 7.4 se vrednost povezav e_2 in e_3 povečuje, saj sta obe mejni povezavi, e_2 pa je še obodna povezava. Vrednost povezave e_1 (in tudi e_3) se sicer nekoliko povečuje, ker je soseda obodni povezavi, vendar pa je e_1 tudi povezava tipa 0-1. Vpliv zaradi lastnosti tipa 0-1 prevlada, zato se njena vrednost zmanjšuje, dokler ne pade na ničlo. Po dvajseti iteraciji (slika 7.5) sta vrednosti povezav e_2 in e_3 že narasli na maksimum (100), zato se njuni vrednosti ne spreminjata več, medtem pa vrednost povezavi e_1 še vedno pada. V 30 iteraciji (slika 7.6) je vrednost povezave $e_1=0$, torej je praktično ni več. Sedaj je povezava e_2 tipa 0-1, torej se njena vrednost zmanjšuje. Ko se njena vrednost dovolj zmanjša (v 40 iteraciji – slika 7.7), postane tudi e_3 tipa 0-1 in tudi vrednost e_3 začne padati. Tako se postopoma znebimo cele odvečne veje (v 60. iteraciji – slika 7.8). Na končni sliki po (100 iteracijah) te veje sploh ni več zaznati (slika 7.9).

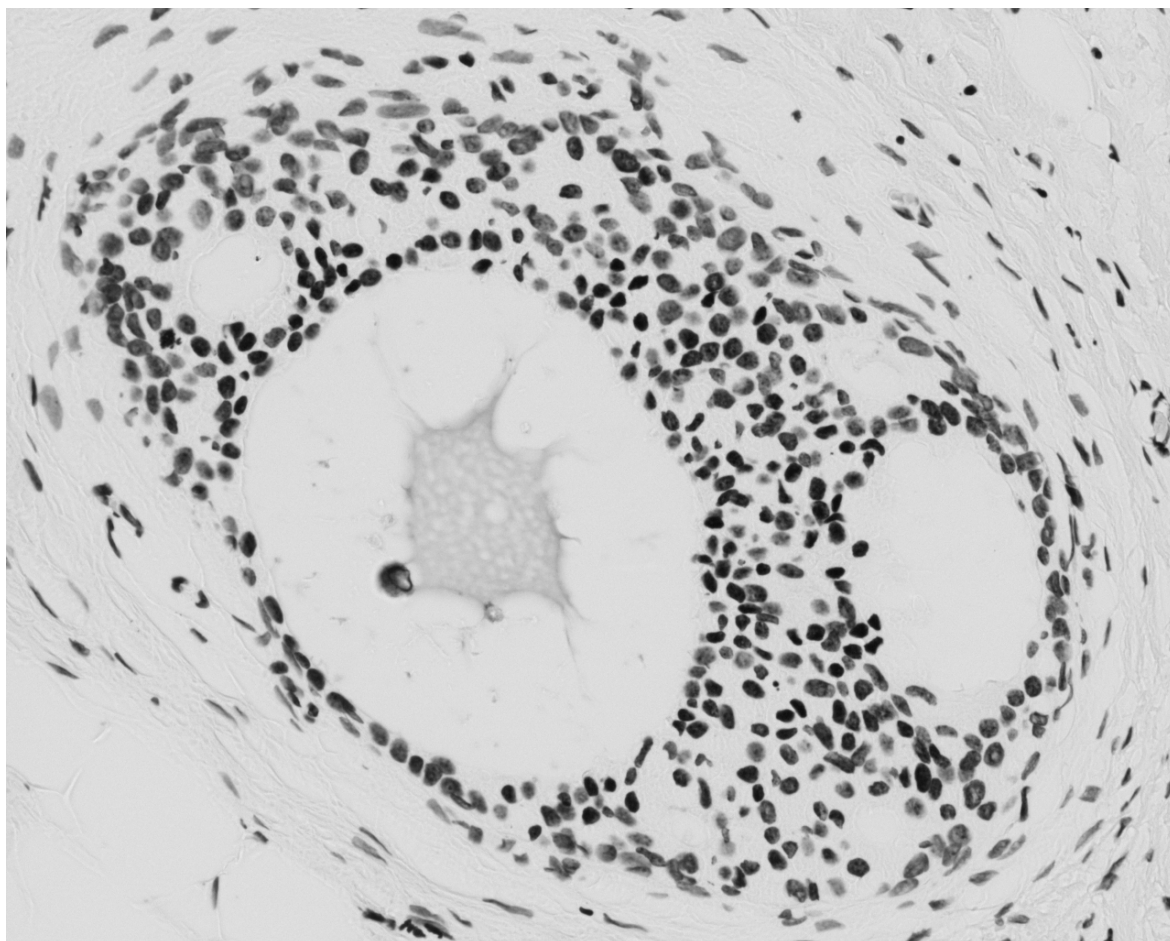


Slika 7.9 Končna slika po 100 iteracijah.

Podobno bi lahko analizirali spreminjanje vrednosti ostalih povezav na sliki.

8 PREISKOVANJE GRAFOV

V postopku relaksacije smo vsaki izmed povezav, ki smo jih izbrali v postopku izbiranja najustreznejših povezav, določili ceno. Povezave, katerih vrednost presega 98, tvorijo graf povezav. Iz slik je razvidno (slika 8.1), da robovi skupkov, ki jih tvorijo celična jedra, niso ostri, ampak lepo zaobljeni. Cilj preiskovanja grafov je, poiskati daljše lepo zaobljene krivulje, ki so lahko tudi sklenjene. Te krivulje predstavljajo robove skupkov celičnih jeder.



Slika 8.1 Robovi skupkov celičnih jeder so zaobljeni in ne ostri.

8.1 DEFINICIJA GRAFA

Vozlišča v grafu predstavljajo povezave, ki smo jih določili kot robne v postopku relaksacije. Dve povezavi sta v grafu preiskovanja sosednji, če imata eno skupno vozlišče na sliki.

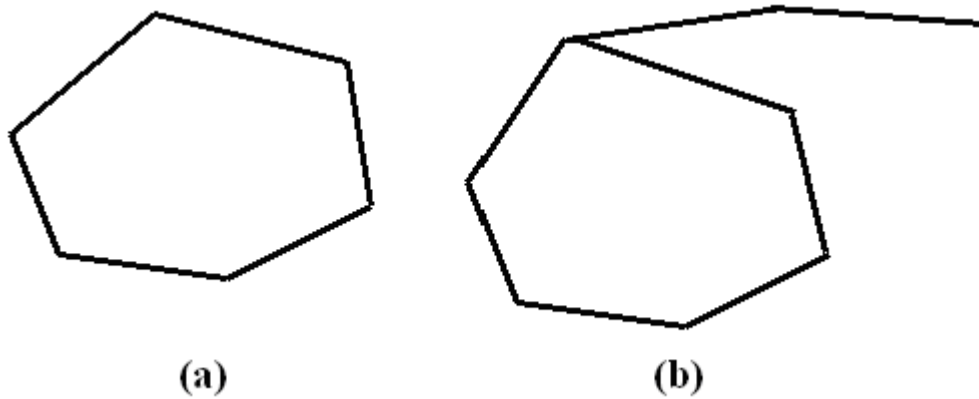
8.2 STRATEGIJA PREISKOVANJA

Izbrali smo strategijo preiskovanja grafa v globino. Prednost pred preiskovanjem v širino ali celo usmerjenim preiskovanjem smo ji dali zato, da smo zmanjšali prostorsko zahtevnost [10]. Pregledati smo hoteli vse možne poti skozi graf. Nismo iskali le najboljše rešitve. Krajše poti so bile v našem primeru slabše rešitve kot daljše poti.

Poti v grafu nismo omejili le na zaporedje sosednjih povezav [7], ampak pot tudi ni smela vsebovati dveh sosednjih povezav, ki bi skupaj oklepali kot manjši od 110° .

Če bi hoteli resnično pregledati vse poti, bi morali postopek iskanja poti izvesti na vsakem vozlišču v grafu. Ta postopek vodi v kombinatorično eksplozijo. Problem smo rešili tako, da smo vsako povezavo, ki je že bila del neke ciklične poti, označili kot že obdelano in je v nadaljevanju nismo vzeli kot začetno vozlišče. Preiskovanje v veji, kjer smo naleteli na povezavo, ki je z zadnjo na poti tvorila kot manjši od 110° , smo ustavili. Prav tako smo preiskovanje ustavili tudi, če smo na neki poti dvakrat naleteli na isto vozlišče povezave. S tem smo preprečili neskončno zankanje. Če je bilo to vozlišče enako tistemu, s katerega smo cel postopek začeli, smo dobili cikel, v nasprotnem primeru pa zanko.

Primer zanke in cikla je na sliki 8.2.



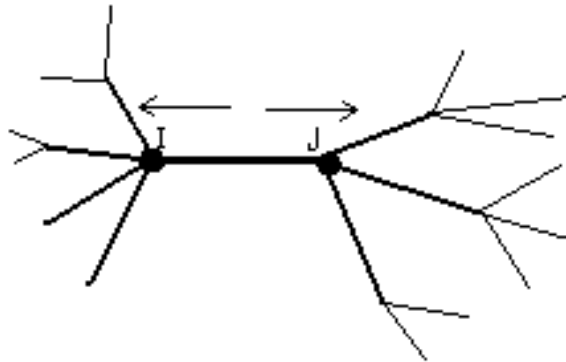
Slika 8.2 (a) Cikel, (b) Zanka

Pri zanki smo del izven cikla obravnavali kot neciklično pot, cikel pa kot ciklično pot. Zanko smo razbili na dva dela.

Postopek nam je torej poiskal dve vrsti poti:

- ciklične poti,
- neciklične poti.

Vsako povezavo smo lahko razvijali v obe možni smeri – levo in desno. Imenovali smo jih I in J smer (slika 8.3).



Slika 8.3 I in J smer

8.3 NORMALIZACIJA POTI

Da smo lahko poti primerjali med sabo, smo jih najprej normalizirali. Vsaka pot je imela spremenljivko, ki je označila pot kot ciklično ali kot neciklično.

8.3.1 NORMALIZACIJA NECIKLIČNIH POTI

Povezave, ki smo jih dobili iz postopka relaksacije smo oštevilčili. Vsaka povezava je imela svojo številko. Pot smo normalizirali tako, da smo definirali začetek poti vedno na tistem koncu, ki se je začel z manjšo številko povezave.

Poti $a(5, 13, 34, 6, 3, 44)$ in $b(44, 3, 6, 34, 13, 5)$ predstavljata isto pot, saj ko pot b normaliziramo, dobimo v bistvu pot a .

$$b_{\text{norm}}(5, 13, 34, 6, 3, 44)$$

8.3.2 NORMALIZACIJA CIKLIČNIH POTI

Normalizacija cikličnih poti poteka podobno kot normalizacija neciklov. Začetek poti vedno predstavlja povezava z najmanjšo številko povezave. Ciklična pot je vedno usmerjena v smer sosedu (glede na začetno povezavo) z manjšo številko povezave. Cikli c , d in e predstavljajo isti cikel, saj so njihove normalizirane oblike enake.

$$d(5, 34, 23, 1, 8, 24) \rightarrow d_{\text{norm}}(1, 8, 24, 5, 34, 23)$$

$$e(23, 1, 8, 24, 5, 34) \rightarrow e_{\text{norm}}(1, 8, 24, 5, 34, 23)$$

$$f(1, 23, 34, 5, 24, 8) \rightarrow f_{\text{norm}}(1, 8, 24, 5, 34, 23) \quad \text{Tu smo obrnili smer.}$$

$$d_{\text{norm}} = e_{\text{norm}} = f_{\text{norm}}$$

8.4 SEŠTEVANJE POTI

Poti I in J seštejemo tako, da združimo eno pot iz množice I s potjo iz množice J . Seštejemo vse možne kombinacije poti iz I in iz J .

primer

$$i(3, 6, 24, 4)$$

$$j(3, 46, 2, 16)$$

$$(i+j)_{\text{norm}}=(4, 24, 6, 3, 46, 2, 16)$$

Pri seštevanju moramo paziti tudi na to, da lahko dve poti tvorita skupaj različne kombinacije cikličnih in necikličnih poti in te primere moramo ustrezno obravnavati.

8.5 ALGORITEM PREISKOVANJA

Uporabili smo metodo preiskovanje v globino.

Na začetku so vse povezave označene kot neobdelane.

za vsako še neobdelano povezavo

poiščemo vse poti skozi to povezavo

poti so lahko:

ciklične

neciklične

vsako povezavo, ki je bila del kakšne najdene poti, označimo kot obdelano

uredimo vse poti: I in J poti seštejemo. Seštete I in J poti ter cikli tvorijo množico poti skozi povezavo. V globalno množico vseh rešitev dodamo le tiste, ki jih v globalni množici še ni.

8.6 ELIMINACIJA POTI

8.6.1 ELIMINACIJA KRATKIH POTI

Eliminiramo vse poti, ki vsebujejo manj kot 5 povezav.

8.6.2 ELIMINACIJA PODOBNIH POTI

Algoritem najde več zelo podobnih poti. To pomeni, da se poti med seboj razlikujejo v majhnem številu povezav, potekajo skoraj po isti poti. V takem primeru skušamo ohraniti le najboljše poti. Vsako pot ocenimo z eno izmed funkcij (6.1 ali 6.2) in ohranimo najboljšo.

$$\frac{1}{n-1} \sum \theta \quad (6.1)$$

n je število vseh povezav na poti

θ kot med dvema sosednjima povezavama na poti

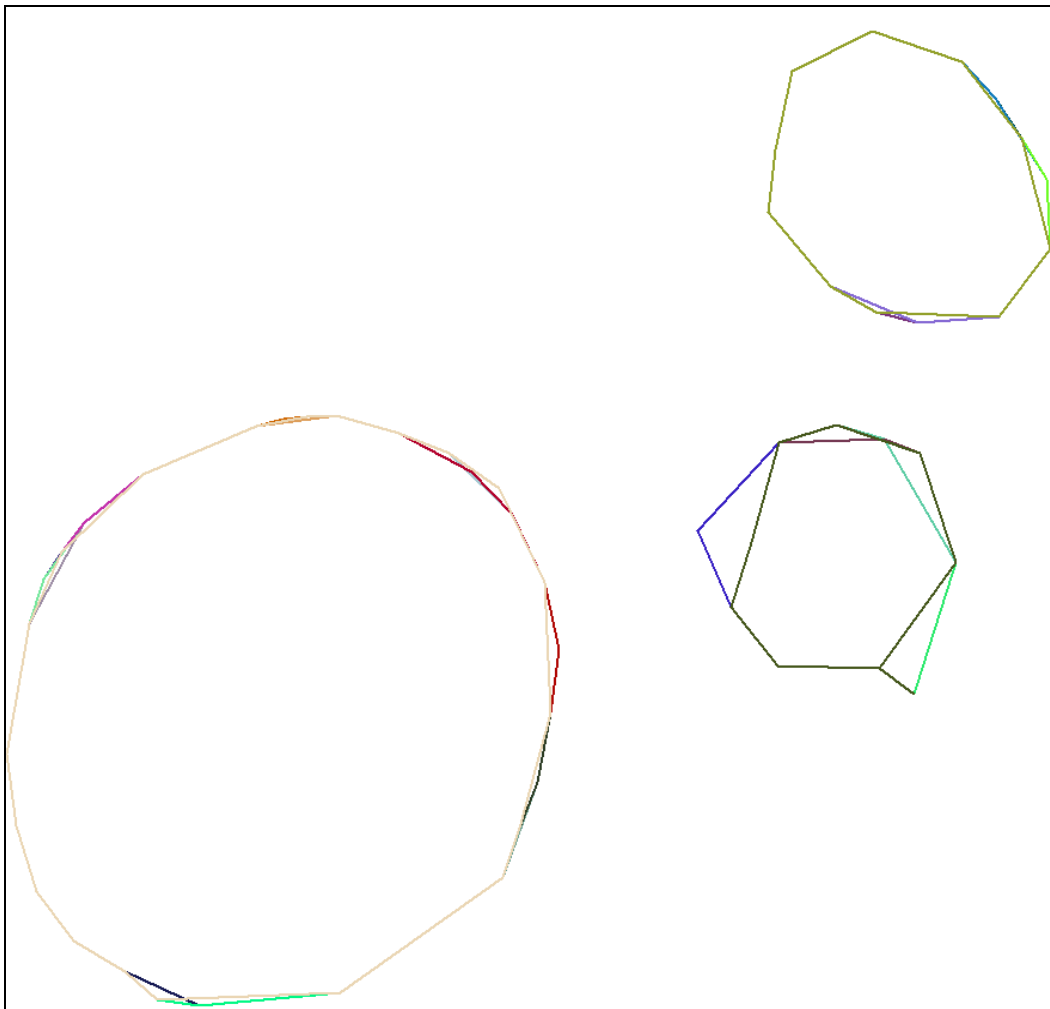
$$\frac{1}{n-1} \sum \theta + \frac{1}{n} \sum v \tag{6.2}$$

v je vrednost posamezne povezave

Mi smo uporabili prvo (6.1). Vrednost posamezne povezave ni igrala vloge, saj smo iz relaksacije dobili le povezave z visoko vrednostjo (97-100). Če pa bi se odločili, da bi preiskovanje grafov izvedli na vseh povezavah, ki smo jih obravnavali v postopku relaksacije, bi bila bolj primerna druga (6.2) funkcija, saj bi imeli v tem primeru opravka z zelo različnimi vrednostmi povezav.

8.7 PRIMER PREISKOVANJA GRAFOV

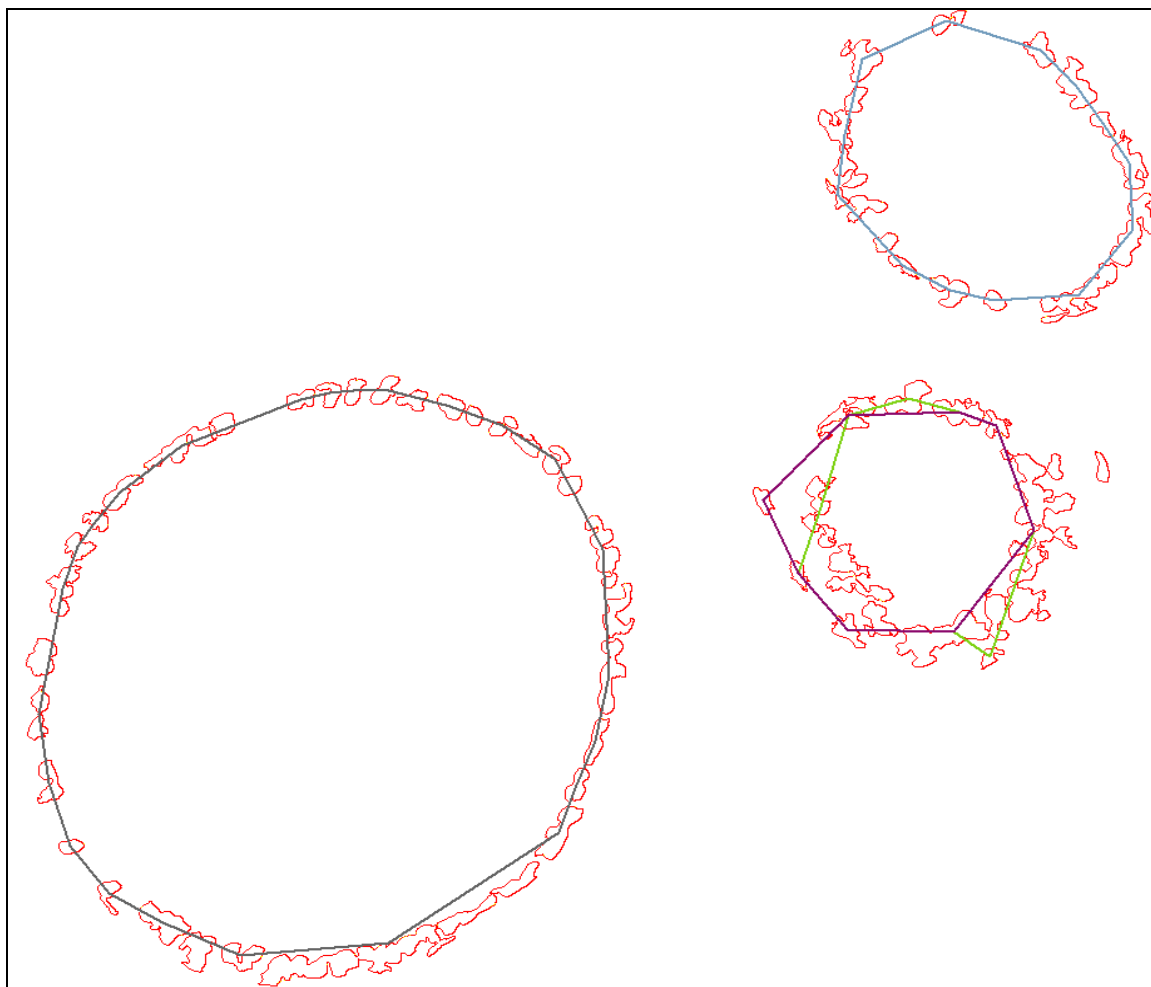
Sliki 8.4 prikazuje poti, ki jih najde algoritem preiskovanja v globino. Na sliki 8.5 smo eliminirali kratke poti.



Slika 8.4 Brez eliminacije podobnih poti

Vsaka pot je narisana s svojo barvo, vendar ker se poti prekrivajo, v večini primerov ni videti celih poti, ampak le njihove odseke. Slika 8.5 prikazuje iste vode, le da smo tu eliminirali tudi podobne poti.¹

¹ Na sliki 8.5 so prikazana tudi segmentirana jedra zaradi lepšega prikaza.



Slika 8.5 Podobne poti eliminiramo

Postopek eliminiranja podobnih poti je najlepše videti v primeru ciklov, saj nam da kot rezultat le eden, to je najboljši cikel, ne pa cele množice cikličnih poti.

Na sliki 8.5 ima najmanjši vod dve poti. Obe je ohranil zato, ker imata glede števila vseh povezav v ciklih premalo skupnih povezav.

9 ANALIZA REZULTATOV

V tem poglavju so najprej predstavljene vse slike, ki smo jih imeli na voljo pri poskusu. Navedene so tudi lastnosti posamezne slike: diagnoza ter parametri, ki smo jih uporabili pri poskusu (prag za velikost delcev, prag za segmentacijo in prag za oddaljenost delcev med seboj).

V razdelku 9.3 je grafičen prikaz rezultatov in njihova analiza. Sledita še razdelka 9.4 in 9.5, ki vsebujeta predloge za izboljšanje postopka in alternativne pristope k problemu raka na dojki.

9.1 PARAMETRI

prag za velikost delcev

prag za segmentacijo

prag za oddaljenost delcev med seboj

MALIGNI

1341a

250 90
55

1341b

200 90
60

1341e

200 115
60

1343c

150 114
60

1442d

150 127
80

1442e

150 145
55

1442f

150 128
100

1442g

700 190
100

POTENCIALNO MALIGNI DUKTUSI

1438a

287 165
87

NORMALNI DUKTUSI

1343b

60 103 ali 60 115
24 ali 26

1442a

200 60
70

1442b

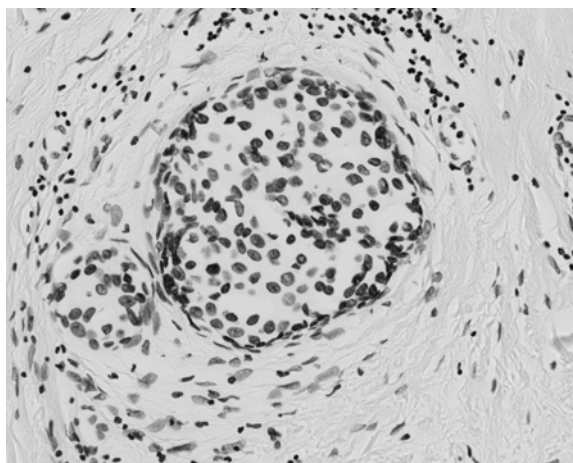
50 55
60

1442c1

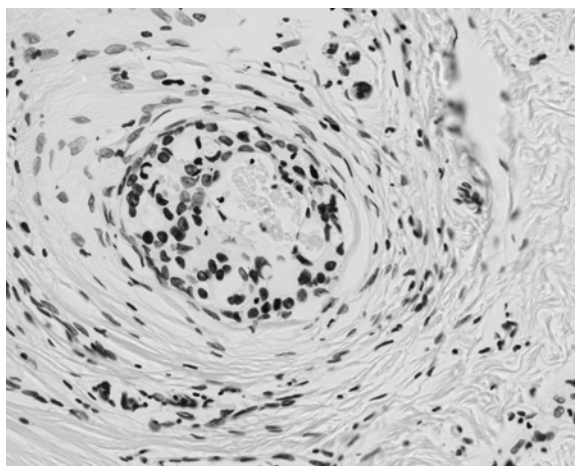
50 90
70

9.2 SLIKE

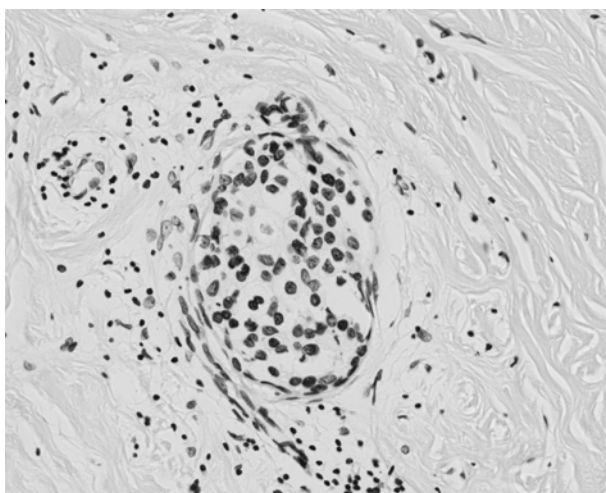
V tem razdelku so prikazane vse slike, ki smo jih imeli na voljo pri poskusu.



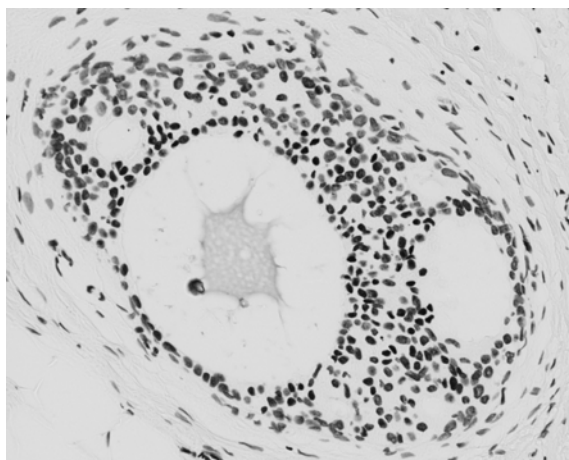
Slika 9.1 1341a



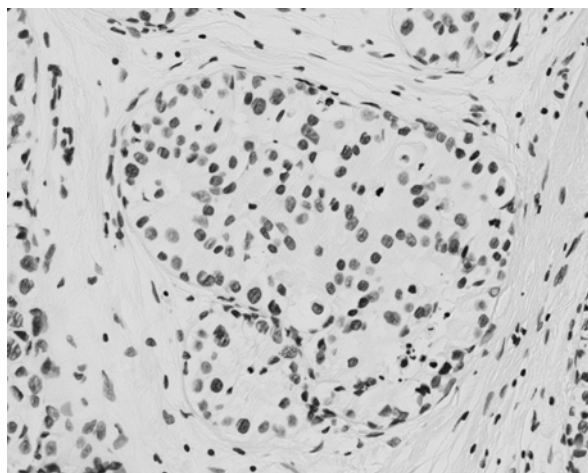
Slika 9.2 1341b



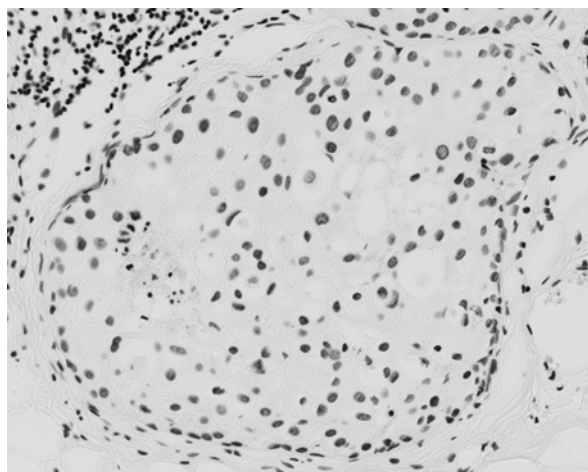
Slika 9.3 1341e



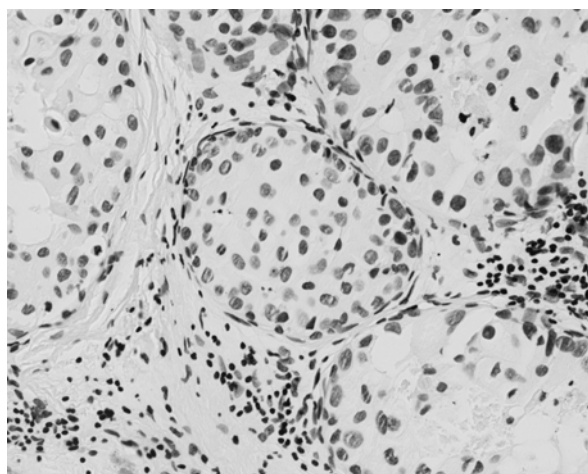
Slika 9.4 1343c



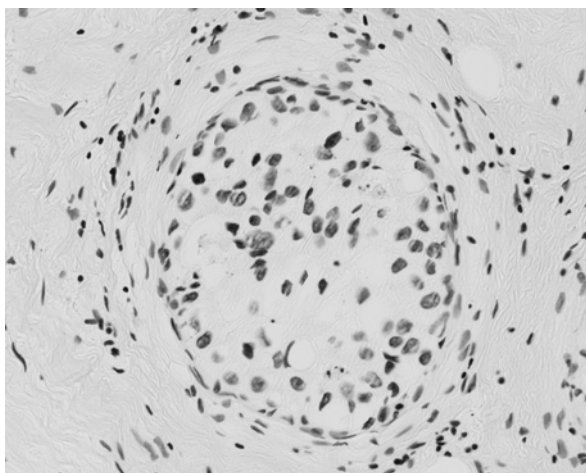
Slika 9.5 1442d



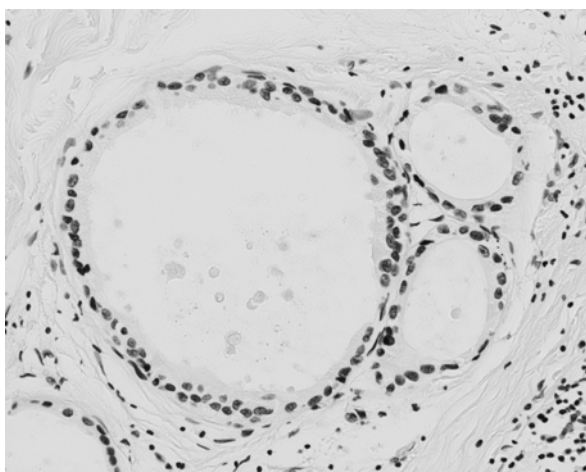
Slika 9.6 1442e



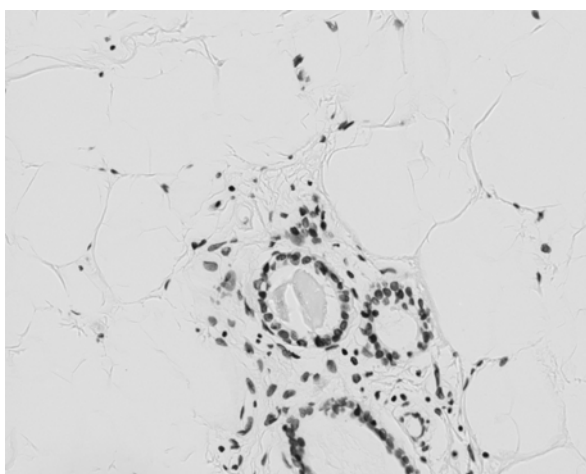
Slika 9.7 1442f



Slika 9.8 1442g



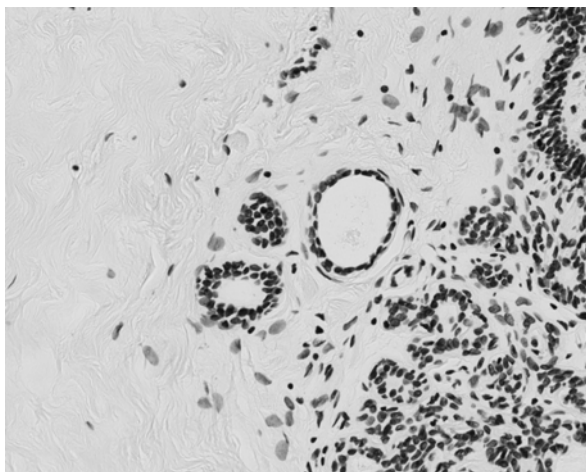
Slika 9.9 1438a



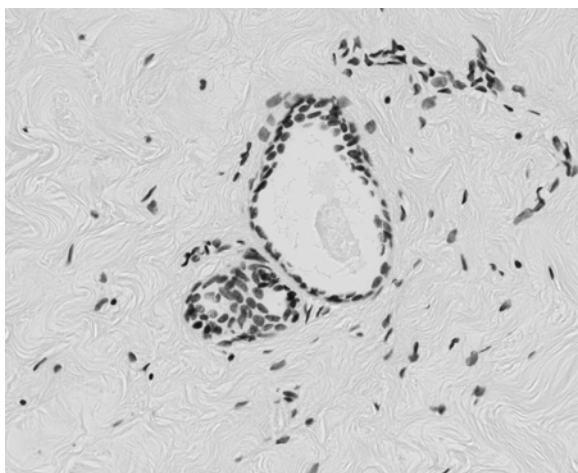
Slika 9.10 1434b

c

Slika 9.11 1442a



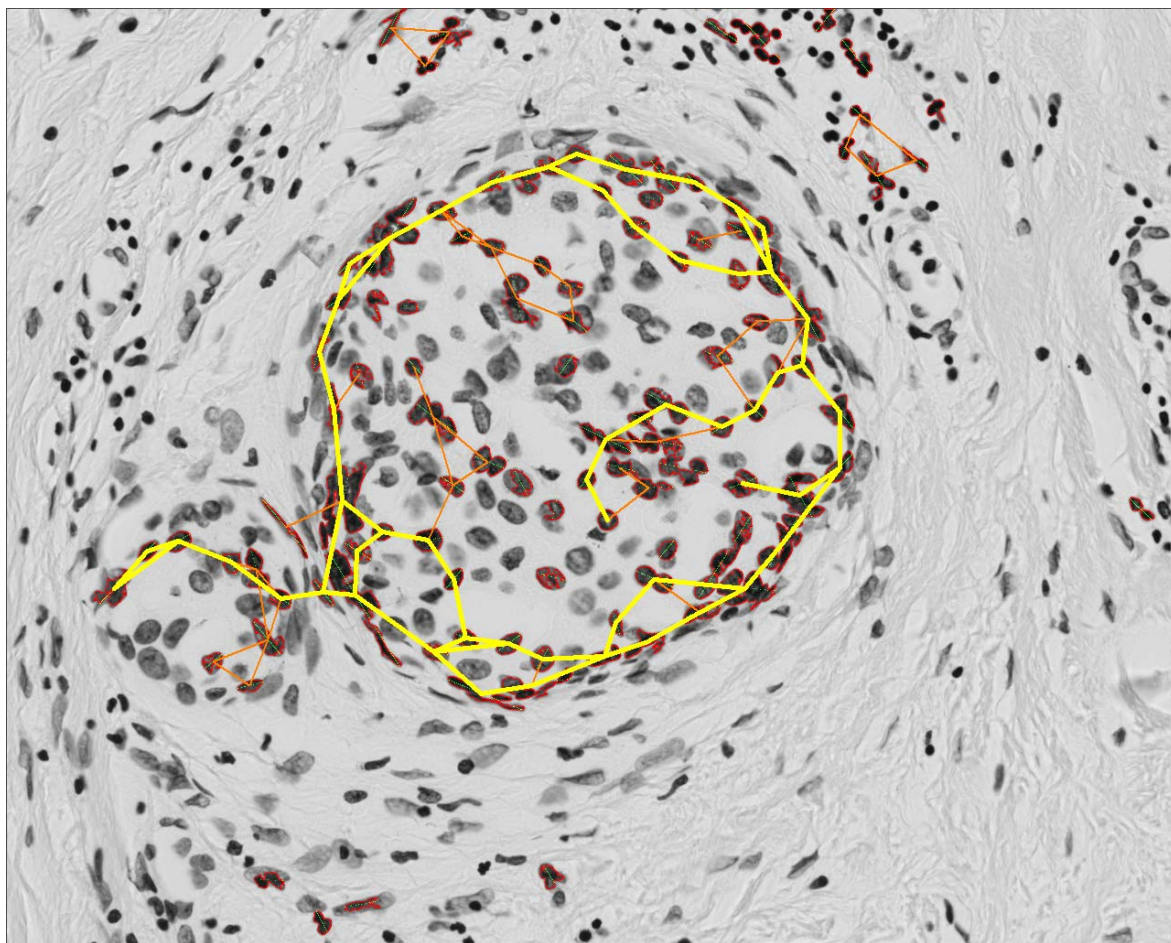
Slika 9.12 1442b



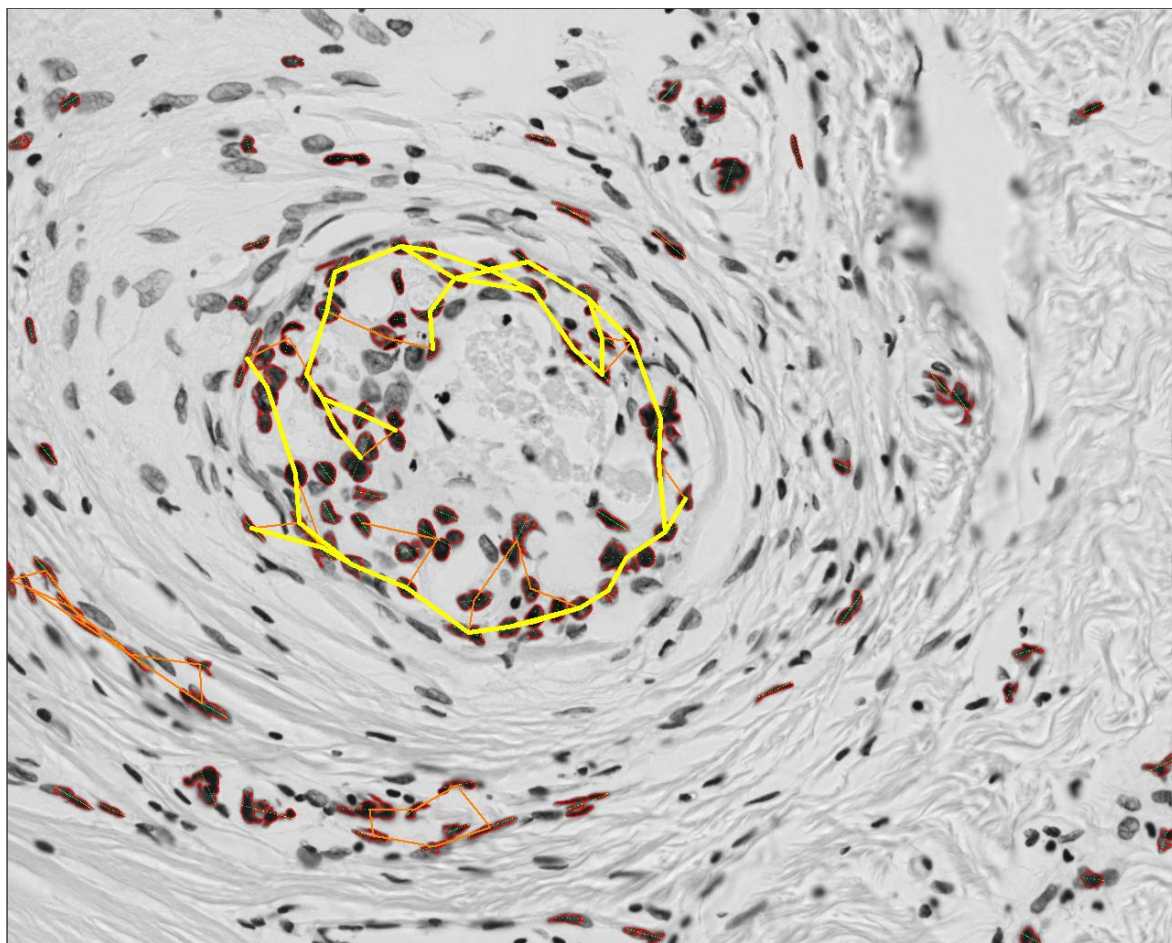
Slika 9.13 1442c1

9.3 OBDELANE SLIKE

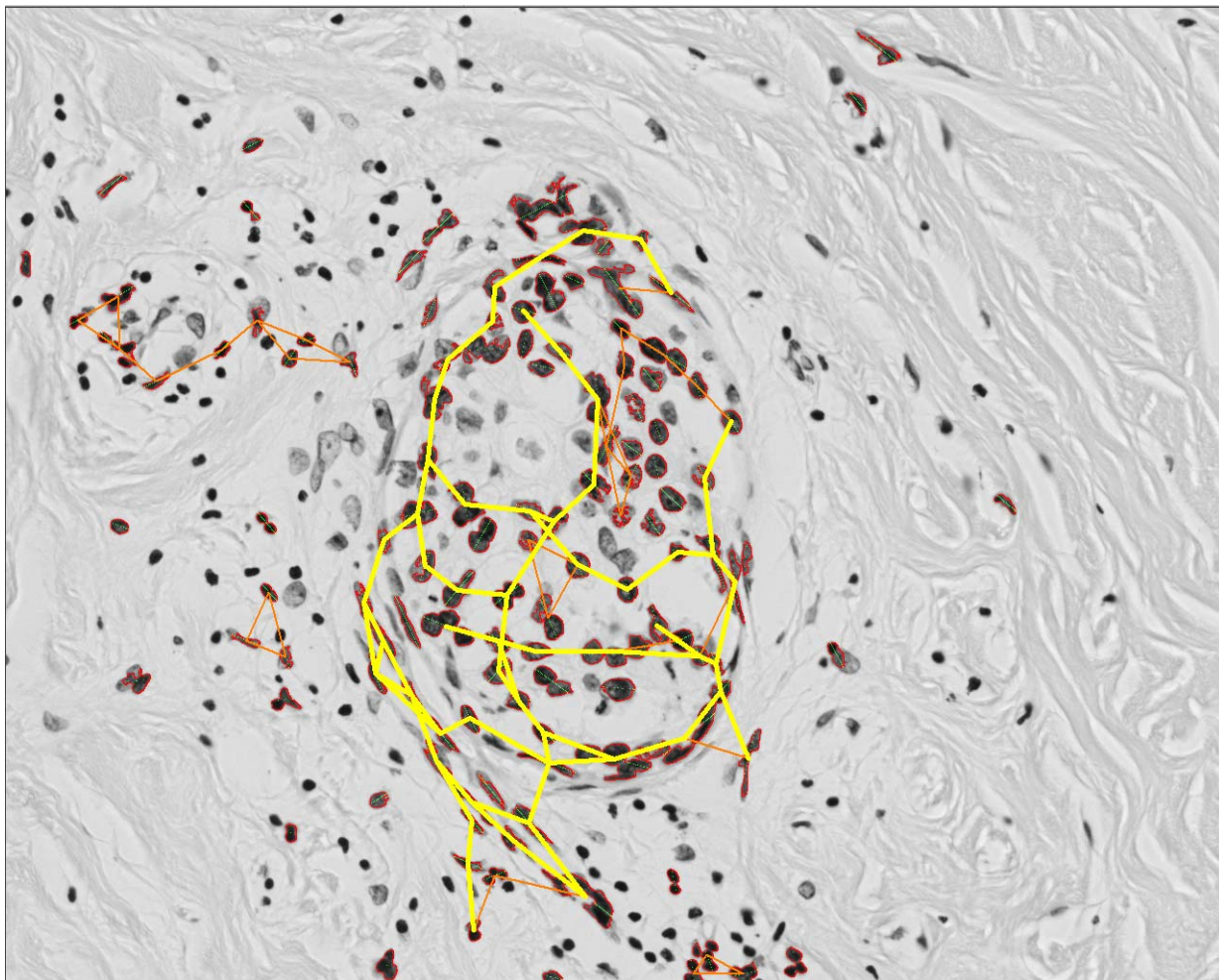
V tem razdelku so prikazani rezultati metode iskanja robov skupkov celičnih jeder na nekaterih slikah. Z rumeno barvo so označene poti, ki so rezultat preiskovanja grafov, z oranžno pa vse povezave, ki tvorijo graf.



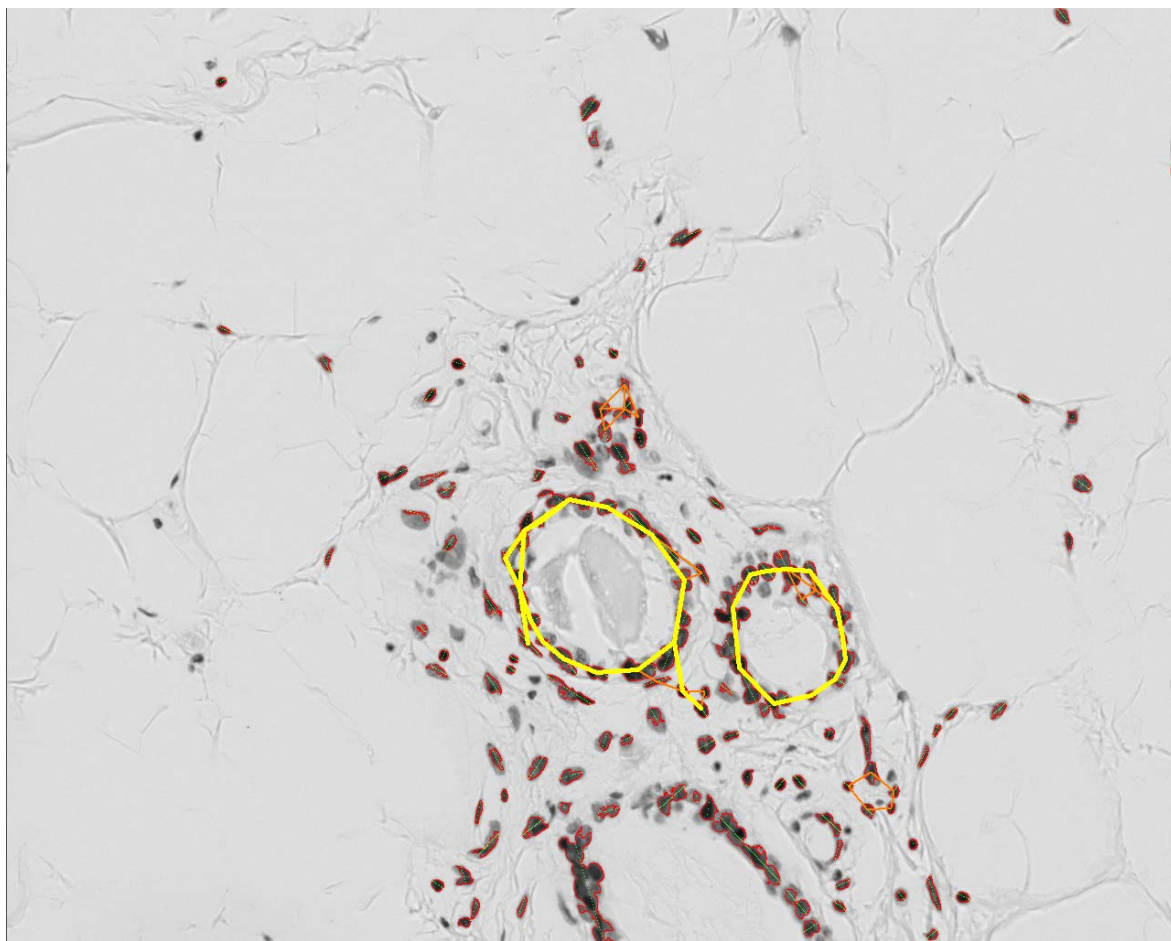
Slika 9.14 1341a



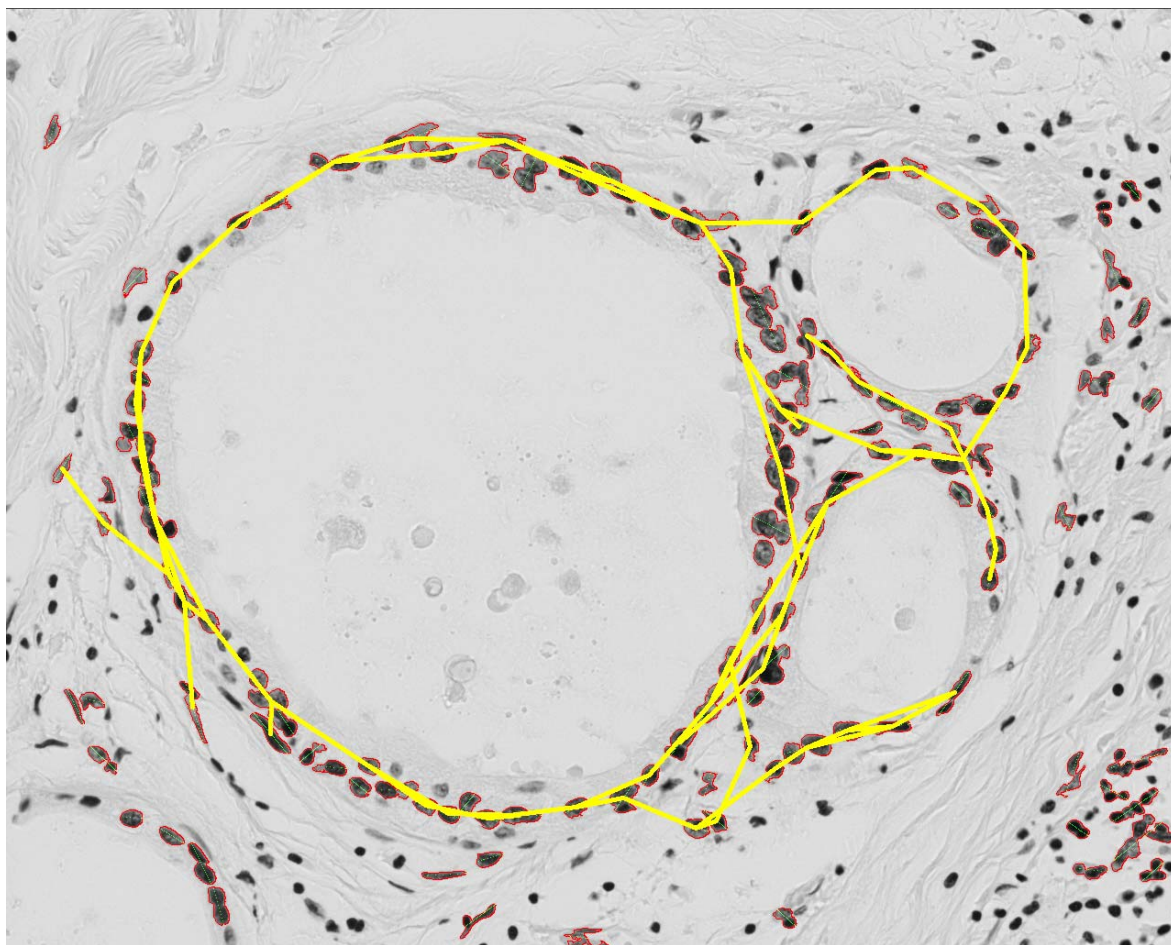
Slika 9.15 1442b



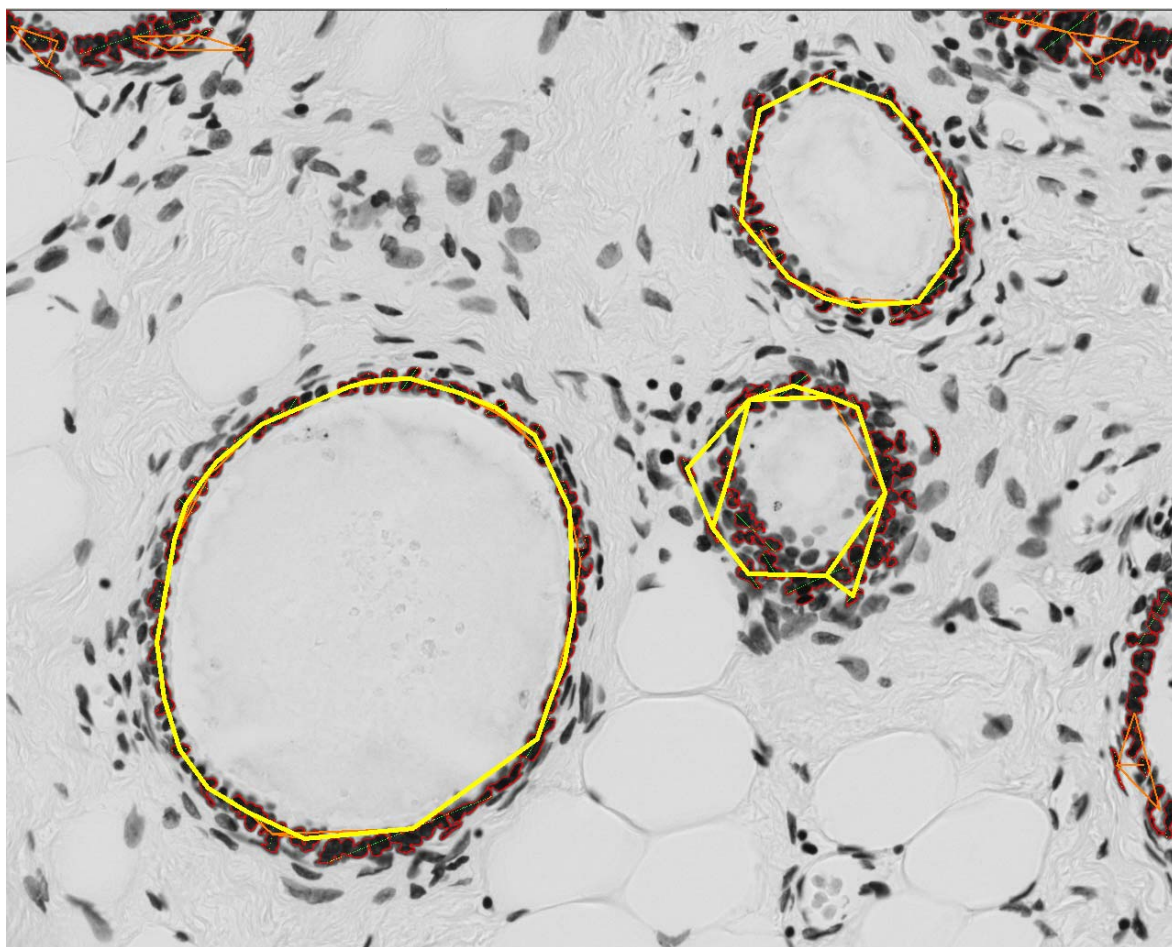
Slika 9.16 1341e



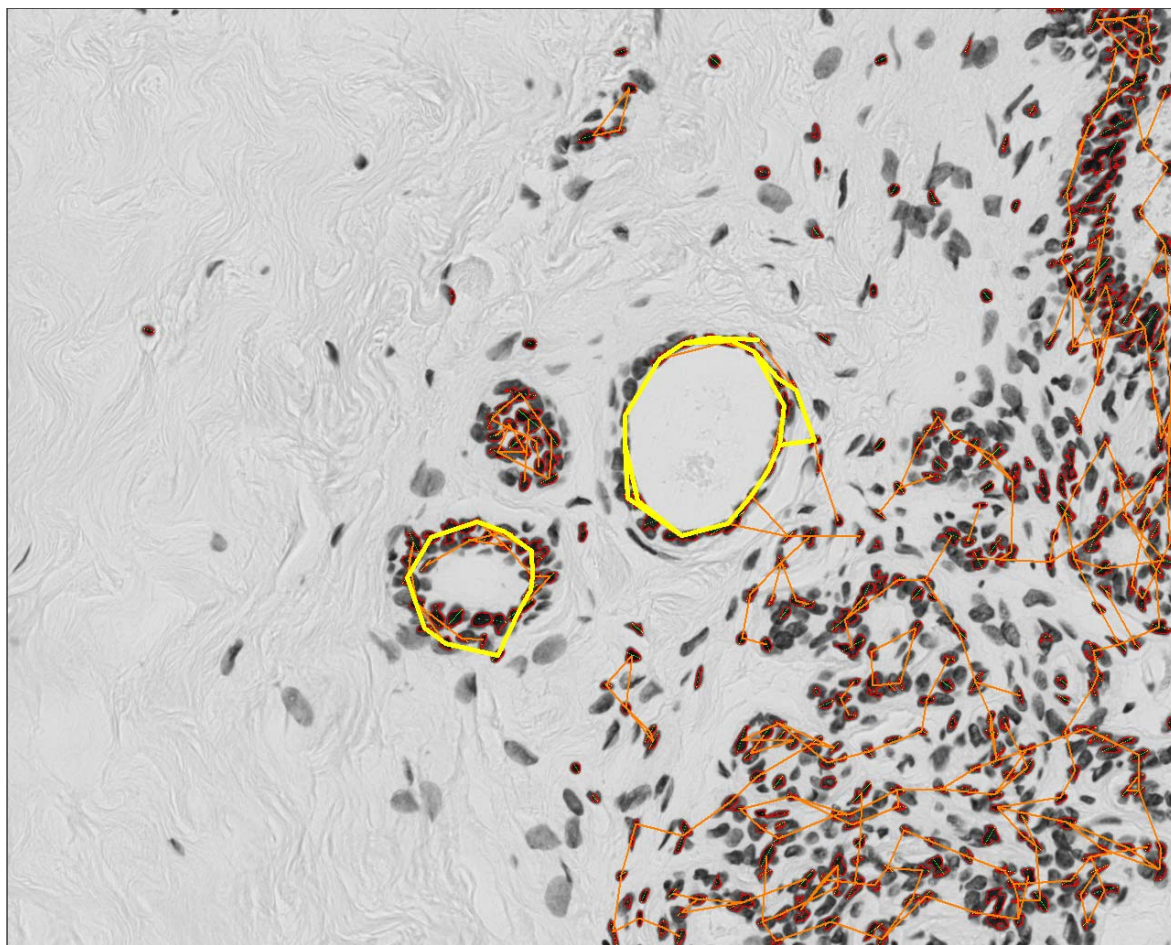
Slika 9.17 1343b



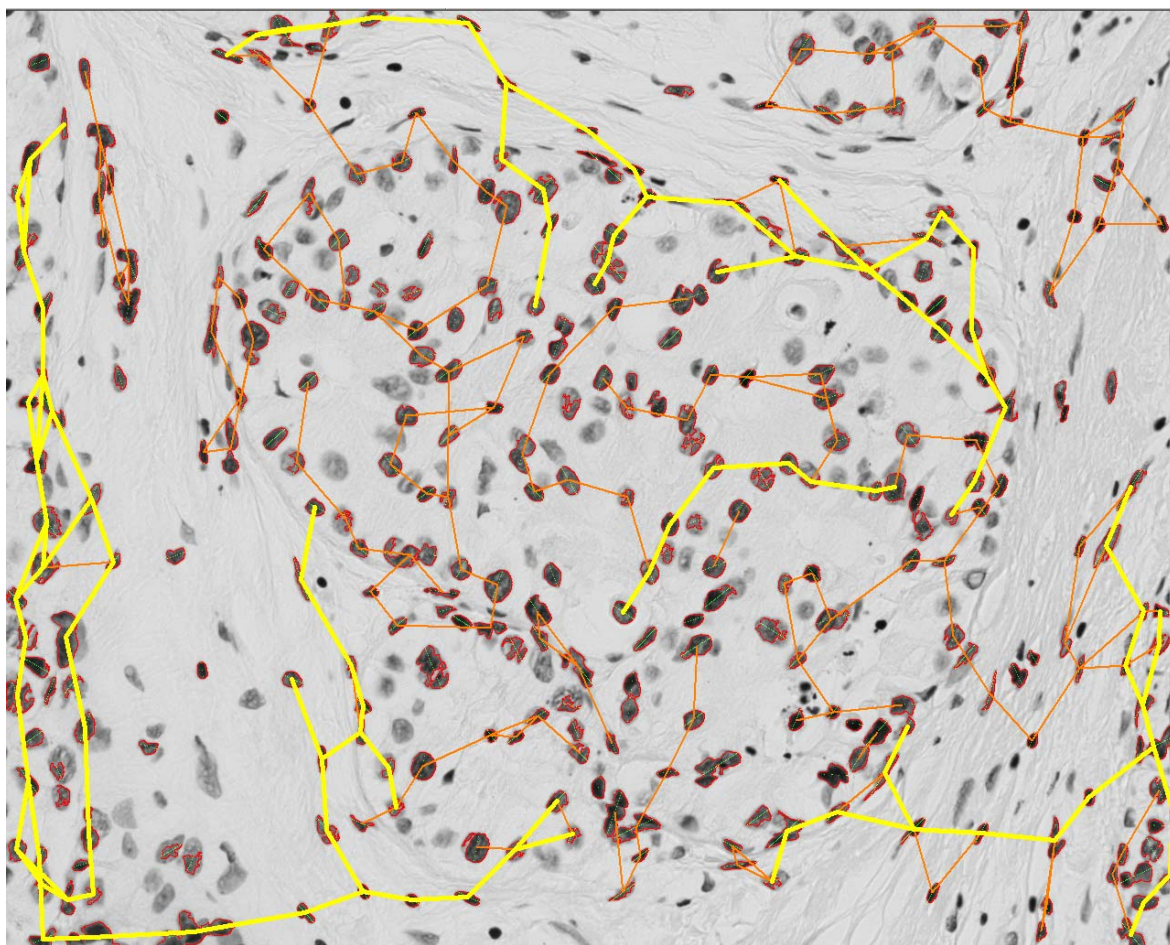
Slika 9.18 1348a



Slika 9.19 1442a



Slika 9.20 1442b



Slika 9.21 1442d

9.4 ANALIZA REZULTATOV

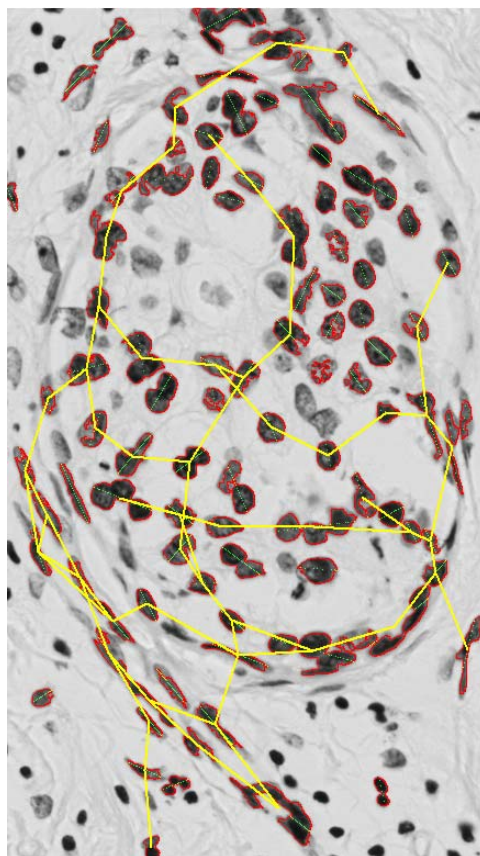
Značilnost rakavega tkiva je nenadzorovana rast oz. nenadzorovana delitev celičnih jeder. Celice zdravega tkiva so natančno programirane. Tudi oblike, v katere se združujejo celice istega tkiva, so si med seboj podobne, so pravilne in enakomerne. Pri rakavih celicah se ta program podre, skupki celic se združujejo v nepravilne oblike, nenavadne za posamezno vrsto tkiva. Ravno ta razlika med pričakovanimi pravilnimi in nepravilnimi oblikami je bila zelo občutna pri samem programiranju in tudi pri rezultatih.

Ko smo hoteli izolirati posamezen vod, se je izkazalo, da pri zdravih, normalnih vodih celice okrog mlečnega voda tvorijo lep sklenjen prazen obroč¹. Zdrave vode smo lahko predstavili

¹ Mi smo slučajno imeli same sklenjene krivulje - obroče. Glavna značilnost zdravih vodov je enakomerno sklenjena homogena krivulja, ki oklepa praznino.

kot približek enostavne gladke krivulje – kroga. Pri malignih vodih je bila že sama izolacija izredno težak problem. Krivulje največkrat sploh niso bila sklenjene, poleg tega so se robovi pojavljali tudi v notranjosti kanala, kajti v primeru malignih vodov se celice razrastejo povsod znotraj voda. Zunaj voda pa se rakave celice v primeru DCIS ne pojavljajo, saj se pri tej diagnozi rak še ni razširil čez bazalno membrano voda v okolno tkivo.

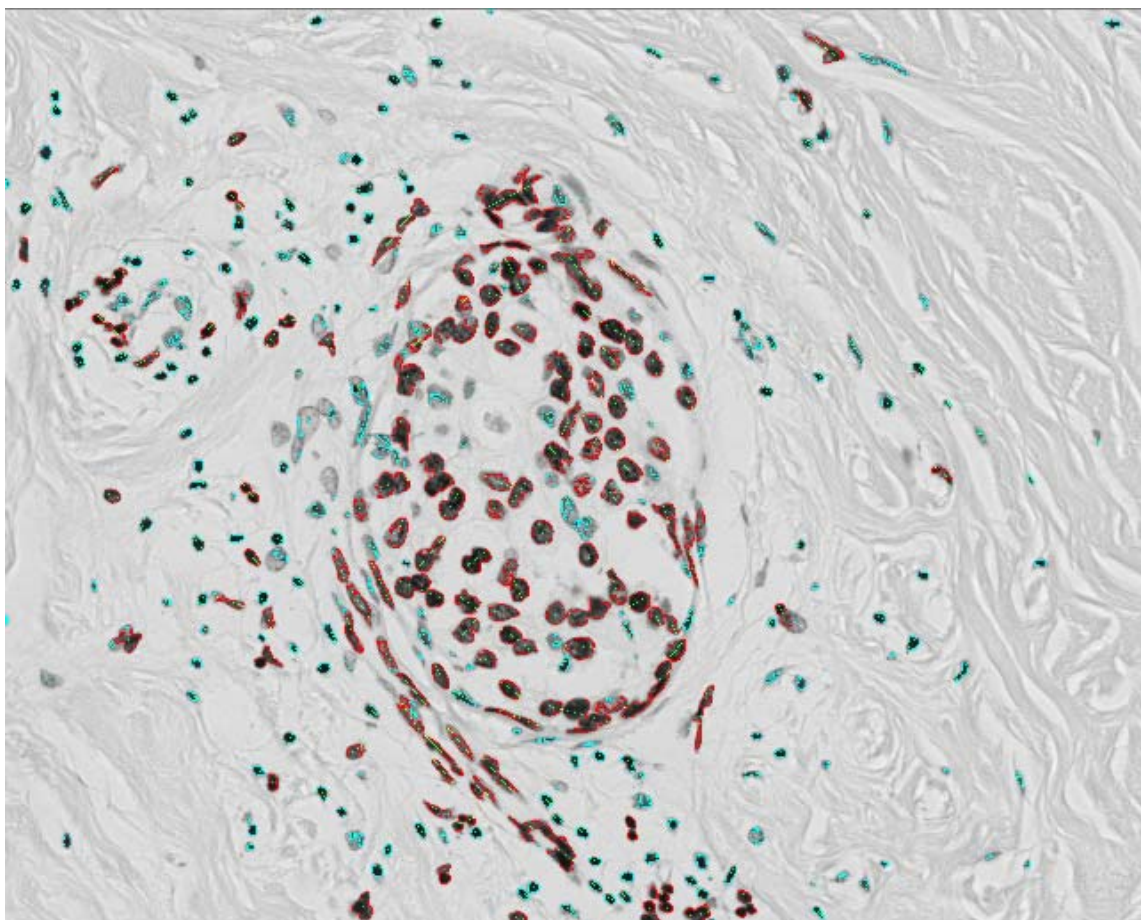
Ker so oblike vodov z rakom precej nepredvidljive, je bilo težko izbrati pravila in parametre, ki bi ustrezale večini slik. Pravilo, ki je ustrezalo eni sliki, se je na drugi izkazalo kot napačno. Motila je predvsem neenakomerna porazdelitev jeder po samem robu voda. Predvsem so se pojavljale napake tam, kjer je bila na robu praznina – prekinitev roba. Primer prikazuje slika 9.22.



Slika 9.22 Prekinitev roba

Pri izolaciji malignih duktusov smo si pomagali z ugotovitvijo, da so rakava jedra navadno večja. Tako smo precej jeder, ki niso pripadala rakavemu žleznemu tkivu, ampak zdravemu

vezivnemu tkivu in niso bili predmet našega zanimanja, izločili že pri segmentaciji s pomočjo praga za velikost objektov (slika 9.23).

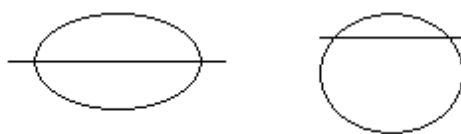


Slika 9.23 Zdrava vezivna jedra so manjša od rakavih žleznih jeder.

Algoritem je imel dodatne težave, če so se v neposredni bližini voda pojavljali objekti, ki niso del voda in jih v postopku segmentacije nismo izločili. V nekaterih primerih so bili to sosednji vodi (slika 9.5 1442d). V nekaterih primerih pa ti delci niso predstavljali rakavih jeder, ampak jedra limfocitov, ki tudi vsebujejo DNA in se tudi obarvajo temnejše (slika 9.12 1442b). Šumna okolica je predvsem moteča pri rakavih vodih, saj je tu potrebna večja toleranca oddaljenosti med posameznimi jedri. Pri normalnih vodih ta šum lahko odpravimo bodisi v koraku relaksacije ali pa v koraku preiskovanja grafov (slika 9.21 1442b).

Pri sami segmentaciji je bila moteča tudi razlika v svetlosti jeder. Svetlejših jeder večkrat sploh nismo detektirali. Različna intenziteta barv jeder je odvisna od več dejavnikov:

- velikost jedra in količina DNA (manjše jedro z večjo količino in posredno tudi večjo gostoto je temnejše obarvano kot večje jedro z enako količino DNA),
- faza celičnega ciklusa, v kateri se jedro nahaja. V fazi, imenovani G2M, jedro vsebuje dvakratno količino DNA in je zato tudi temnejše obarvano,
- stanje celice: jedra, ki odmirajo, so v piknotičnem stanju, imajo zgoščen kromatin in izgledajo manjša in temnejša,
- priprava vzorca: če jedro pri pripravi preparata odrežemo bolj pri vrhu, je manjše in hkrati vsebuje manj DNA,



Slika 9.24 Prerez jedra

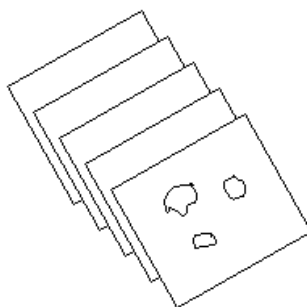
- kvaliteta barvanja.

9.5 PREDLOGI ZA IZBOLJŠANJE POSTOPKA

Celoten postopek bi bil precej bolj enostaven, če bi lahko uporabili barvanje, ki bi obarvalo celice oz. jedra le določenega tkiva, v našem primeru žleznega tkiva. Vendar takega barvanja zaenkrat še ne moremo uporabljati skupaj z barvanjem za DNK. Pomagati si moramo na drugačne načine.

Več informacij bi lahko dobili, če bi imeli več prereзов istega preparata. Tako bi lahko sestavili 3D sliko voda (slika 9.25).

Segmentacijo bi lahko izboljšali tako, da bi objekte, ki so blizu skupaj in jih segmentiramo kot en sam objekt, razbili. Tako bi izločili več jeder vezivnega tkiva in ohranili več velikih in svetlih jeder vodov.



Slika 9.25 Več prerezov združimo v 3D sliko.

Naše ugotovitve bi morali preizkusiti na večji bazi slik, saj je zbirka 13 slik premajhna, da bi delali splošne zaključke.

Kljub pomanjkljivostim postopka lahko pravilno zaključimo, da rakavi vodi tvorijo pravilne oblike, oblike malignih pa so precej razgibane.

Za nadaljnjo obdelavo so najbolj primerni podatki v obliki števil. Naše slike bi lahko parametrizirali tako, da bi podali število povezav (lahko tudi poti) na površino posameznega voda. To bi lahko bil nekakšen pokazatelj razgibanosti voda.

Možnosti za izračun razgibanosti je več. Po vseh spodaj naštetih možnostih pa bi imeli rakavi vodi manjšo numerično vrednost kot rakavi vodi.

Variante za izračun razgibanosti:

- prešteli bi vse poti, ki smo jih našli v vodu,
- prešteli bi samo poti, ki segajo tudi v notranjost voda,
- prešteli bi povezave, ki se pojavljajo v notranjosti voda. V tem primeru bi lahko prešteli kar vse povezave v notranjosti, ki smo jih dobili iz koraka relaksacije, ne pa samo tistih, ki tvorijo poti.

Zdravi vodi bi imeli vrednost blizu 0 oz. 1, rakavi pa večjo, odvisno od strukture posameznega voda.

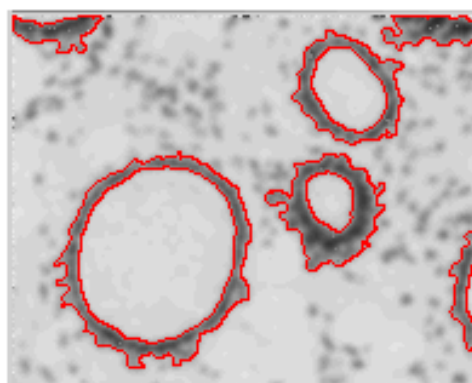
Opozoriti moramo tudi na to, da je velikost in delno tudi oblika vodov na slikah odvisna od priprave preparata. Podobno kot pri jedrih so tudi slike vodov odvisne od tega, kje je narejen prerez tkiva. Torej nam da še največ informacije sama razgibanost voda, ki pa bi jo v našem primeru z nekaj dodatne logike lahko numerično prikazali.

Potrebna bi bila tudi večja avtomatizacija postopka. To pomeni, da parametrov za prag segmentacije, za prag velikost delcev in za največjo dovoljeno razdaljo med jedri ne bi nastavljali ročno, ampak avtomatsko. Parametri, ki smo jih uporabili, so navedeni v poglavju 9.1. Vendar je bilo število slik premajhno, da bi iz teh podatkov sklepali v splošnem. V glavnem imajo vsi rakavi vodi večji prag za velikost jeder, za avtomatsko določitev praga velikosti pa bi morali natančno pregledati večjo bazo slik.

9.6 ALTERNATIVNI NAČINI OBDELAVE SLIK CELIČNIH JEDER

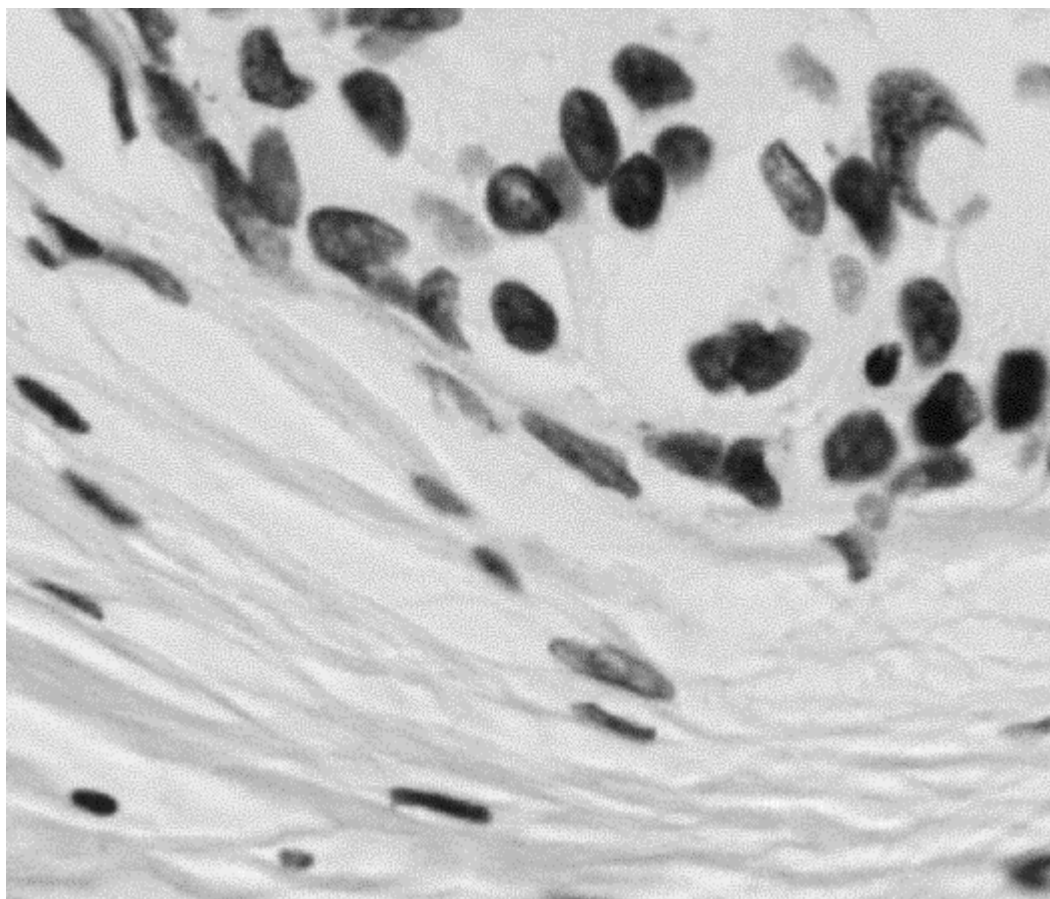
Iskanja vodov bi se lahko lotili tudi na drugačne načine. Možnosti je veliko. Dve izmed mnogih sta naslednji:

1. Sliko bi najprej zmanjšali in zgladili z mediana filtrom. Nato bi lahko izvedli segmentacijo. Pri zdravih vodih bi dobili nekakšne kolobarje (slika 9.26). Rakavi vodi pa bi se v različnih primerih različno obnašali.



Slika 9.26 Sliko pomanjšamo, zgladimo z mediana filtrom in nato segmentiramo.

Položaj vodov bi lahko ugotavljali tudi s pomočjo vezivnega tkiva. Vezivne celice z medceličnino kot nekakšne nitke obdajajo vod. S pomočjo usmerjenosti teh nitk bi lahko določili položaje vodov (slika 9.27).



Slika 9.27 Vezivne celice z medceličnino kot nekakšne nitke obdajajo vod.

9.7 DIAGNOSTICIRANJE IN OCENJEVANJE TUMORJEV V PRAKSI

V praksi se sama oblika skupkov ne uporablja za diagnostiko raka, pač pa je pomembna razporeditev, organizacija in polarizacija celic v vodih in na njihovem robu. V diagnostiki oz. ocenjevanju tumorjev se vedno uporabljajo arhitekturne značilnosti (razporeditev celic, organizacija, polarizacija itd.) v povezavi z jedrnimi/celičnimi značilnostmi, ki so omenjeni v nalogi. Samo oblika (zunANJI obod) razen izjem navadno ne zadošča za diagnostiko raka.

Odkrivanje robov vodov v povezavi z diagnostiko raka (s pomočjo računalniških programov) se zelo redko omenja v dosegljivi literaturi. V [??] je omenjeno, da se je diagnoza nekoliko izboljšala, če so upoštevali tudi obliko, ki jo tvorijo celična jedra. Ni pa

podrobnejšega opisa, kako so določali obliko, ki jo tvorijo jedra. Na področju citometrije in DCIS je tak pristop nov.

Delo, opravljeno v diplomski nalogi je zelo vzpodbuden uvod za prihodnje delo. Nadaljnje raziskave so vsekakor smiselne, še posebej, če bi se usmerili na kombiniranje arhitekture in jedrnih značilnosti DCIS. To je s pomočjo citometra, ki je last Onkološkega instituta in s pomočjo katerega so bile izdelane tudi slike, predstavljene v diplomski nalogi, izvedljivo. Ocena (omenjenih) ali – *ne vem kaj je boljše* (arhitekturnih in jedrnih) značilnost DCIS je subjektivna in ugotovili so, da je predvsem ocena arhitekturnih značilnosti slabo ponovljiva. Če bi jo objektivizirali s pomočjo programa za obdelavo arhitekture vodov, bi dobili bolj zanesljive in ponovljive informacije o tumorju.

Oprelitev arhitekturnih in jedrnih značilnosti DCIS je osnova za gradacijo DCIS v dobro srednje in slabo diferencirane tumorje. Glede na stopnjo gradusa tumorja se tudi odloča o nadaljnjem zdravljenju bolnice, zato je objektivna ocena zelo pomembna.

Dostikrat se tudi težko loči atipično hiperplazijo (ki se ni rak, je pa predstopnja) od DCIS. Tudi v tem primeru bi bila objektivizacija z računalniško obdelavo v veliko pomoč.

10 ZAKLJUČEK

Analiza slik celičnih jeder v diplomski nalogi nazorno prikazuje razliko med zdravim in rakavim tkivom. Postopek za odkrivanje je namreč pravilno odkril eno izmed morfoloških značilnosti tkiva. Prerezi zdravih vodov imajo pričakovane, pravilne oblike, medtem ko so prerezi rakavih vodov zelo različni in nepredvidljivi. Rakavi vodi so nepravilnih oblik, jedra žleznega tkiva pa se pojavljajo tudi v njihovi notranjosti. Ravno zaradi teh jeder je naš postopek za odkrivanje robov našel robove tudi znotraj le-teh. Robove zdravih vodov je algoritem največkrat predstavil z eno samo , lepo zaobljeno, sklenjeno krivuljo. Robovi pri rakavih vodih pa so sestavljeni iz več nesklenjenih krivulj, ki so segale tudi v notranjost voda.

Natančna analiza večje baze slik ter izpopolnjen algoritem bi nas gotovo privedla do postopka, ki bi z veliko natančnostjo lahko ločeval med zdravimi in rakavimi vodi.

Nadaljnji izziv je gotovo tudi avtomatsko razpoznavanje na samo diagnoze DCIS, ampak tudi njenih podskupin.

Področje raka je tema, s katero se danes ukvarjajo strokovnjaki različnih področij. Prav gotovo je tudi področje računalništva eno izmed tistih, ki bo tudi v prihodnosti veliko prispevalo k uspešnejšemu odkrivanju te bolezni.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju, doc. dr. Alešu Leonardisu, univ. dipl. inž., ki me je s svojim znanjem in s koristnimi nasveti usmerjal pri delu.

Posebna zahvala velja tudi Onkološkemu institutu, oddelku za citopatologijo, laboratoriju za slikovno citometrijo, ki mi je omogočil, da sem se posvetila področju, ki me privlači – medicini. Še posebej se zahvaljujem prof. dr. Mariji Us-Krašovec, dr.med., dr. Jaku Lavrenčaku, dipl. biol., in asist. dr. Margareti Fležar, dr. med., za pripravo slik, študijskega materiala ter za koristne razgovore in napotke, ki so mi dali globlji vpogled v problematiko naloge.

VIRI

- [1] C. Arnold: Tumor Detection and Segmentation in MR Images, Abstract, Computer Vision and System Laboratory of Laval University, Quebec, Canada, July 2000.
- [2] P. Bamford, B. Lovell: A Water Immersion Algorithm for Cytological Image Segmentation. Proceedings of Segment '96, Sydney, December 1996.
- [3] P. Bamford, B. Lovell: Cell Nucleus Segmentation. Cooperative Research Center For Sensor Signal and Information Processing, Department of Computer Science and Electrical Engineering, University of Queensland , Australia, October 1998.
- [4] P. Bamford, B. Lovell: Improving the Robustness of Cell Nucleus Segmentation. Southampton, UK, Proceedings of the ninth British Machine Vision Conference 1998.
- [5] P. Bamford, B. Lovell: Robust Cell Nucleus Segmentation Using a Viterbi Search Based Active Contour. Proceedings of DICTA '97, Conference on Digital Image Computing Techniques and Applications, Auckland, New Zealand, December 1997.
- [6] P. Bamford, B. Lovell: Unsupervised Cell Nucleus Segmentation with Active Contours. Signal Processing Special Issue: Deformable Models and Techniques for Image and Signal Processing. vol 71., no. 2., 1998.
- [7] V. Batagelj: Diskretne Strukture. 4. zvezek, 12. Osnove teorije grafov, maj 1996, Ljubljana.

- [8] R. Bernard: Opis in analiza slik s krožno-simetričnimi modeli. Magistrska naloga, Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani, 5-7, 1999.
- [9] A. Blake, M. Isard: Active Contours: The Application of Techniques from Graphics, Vision, Control Theory and Statistics to Visual Tracking of Shapes and Motion. Springer, 1998.
- [10] Bratko: Prolog in umetna inteligenca. Društvo matematikov, fizikov in astronomov Slovenije, Zveza organizacij za tehnično kulturo Slovenije, Ljubljana, 1989.
- [11] R. Holland, J. L. Peterse, R. R. Millis, V. Eusebi, D. Faverly, M. J. Vijver, B. Zafrani: Ductal Carcinoma In Situ: A Proposal for a New Classification. Seminars in Diagnostics Pathology, VOL 11. No 3, 167-180, August 1994.
- [12] L. Kamensky: Image Segmentation for Image Recognition. Dr Dobb's Journal, 23, 7, 115-118, July 1998.
- [13] J. Lamovec: Patologija malignih tumorjev dojke. Onkološki inštitut, Ljubljana
- [14] K. Lee, N. Street: A Fast and Robust Approach for Automated Segmentation of Breast Cancer Nuclei, Technical Report, University of Iowa, Iowa City, 1999.
- [15] J. Lavrenčak: Pomen svetlih področji v celičnih jedrih, obarvanih po Feulgnovi metodi. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 18, 25, 1998, Ljubljana.

- [16] M. Sonka, V. Hlavac, R. Boyle: Digital Image processing. PWS, 1998.
- [17] E. Trucco, A. Verri: Introductory Techniques for 3-D Computer Vision. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 1998.
- [18] F. Verbinc: Slovar tujk. Dvanajsta izdaja, Cankarjeva založba v Ljubljani, 1997.
- [19] W.H. Wolberg, W.N. Street: Breast Cytology diagnosis Via Digital Image Analysis, April 1993.

IZJAVA O SAMOSTOJNOSTI DELA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Aleša Leonardisa, univ. dipl. inž.. Sodelavce, ki so mi pomagali, sem navedla v zahvali.

Katarina Mele

Ljubljana, v septembru 2000